Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie
(theoretische und experimentelle Radiologie)
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

ORIENTIERENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN ZYTOSTATISCHEN EFFEKT EINER (^{3}H) - CYCLOPHOSPHAMID - STOSSTHERAPIE UNTER DEN BEDINGUNGEN EINER LOKALEN VORBESTRAHLUNG EINES SOLIDEN YOSHIDA - SARKOMS BEI DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

ELISABETH MEEREIS, geb. Geissler
aus München

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie
(theoretische und experimentelle Radiologie)
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

ORIENTIERENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN ZYTOSTATISCHEN EFFEKT EINER (^{3}H) - CYCLOPHOSPHAMID - STOSSTHERAPIE UNTER DEN BEDINGUNGEN EINER LOKALEN VORBESTRAHLUNG EINES SOLIDEN YOSHIDA - SARKOMS BEI DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

ELISABETH MEEREIS, geb. Geissler

aus München

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 14.7.1978
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. E. Schaumlöffel
Correferent: Prof. Dr. H. Bernhardt

INHALTSÜBERSICHT

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODIK	5
1.	Bestimmung der DNS- und Proteinsynthese nach lokaler Tumorbestrahlung bei der Ratte	5
2.	Chemotherapie mit ^{3}H-Cyclophosphamid mit und ohne lokale Vorbestrahlung des Tumors bei der Ratte	6
3.	Radiochemische und biochemische Probenaufbereitung	8
4.	Bestimmung der Überlebenszeiten in der kombinierten Strahlen- und Cyclophosphamid-Therapie	13
5.	Auswertung der Ergebnisse	14
III.	ERGEBNISSE	16
1.	Protein- und DNS-Synthese, sowie Inkorporation von Synthesevorläufern in Muskel, Tumormuskel und Tumor zu verschiedenen Zeiten nach lokaler Tumorbestrahlung	16
2.	Renale Ausscheidungen an ^{3}H-Cyclophosphamid und Metaboliten bis zu 5 Tagen nach i.v. Applikation mit und ohne lokale Vorbestrahlung des Tumors	24
3.	Organkonzentrationen an ^{3}H-Cyclophosphamid und Metaboliten am 5. Tag nach i.v. Applikation mit und ohne lokale Vorbestrahlung	29
4.	Spezifische DNS- und RNS-Gehalte, spezifische Alkylierung der DNS und ^{14}C-Desoxy-Thymidin-Index im Tumor am 5. Tag nach ^{3}H-Cyclophosphamid-Therapie ohne und mit lokaler Vorbestrahlung.	33
5.	Überlebensraten von Ratten mit und ohne lokale Vorbestrahlung des Tumors unter Cyclophosphamid-Therapie	38

IV. DISKUSSION 42

V. ZUSAMMENFASSUNG 56

VI. LITERATURVERZEICHNIS 59

I. EINLEITUNG

Die Therapie maligner Erkrankungen stellt ein höchst aktuelles Problem dar. Klinik und Forschung sind bemüht zu wirksamen Ergebnissen zu gelangen, da die Anzahl der Tumorerkrankungen auch als Folge einer erhöhten Umweltbelastung durch Carcinogene und Cocarcinogene, sowie die Lebenserwartung ständig steigt. Die Krebsstatistik zeigt deutliche Anstiegstendenz für Krebsmorbidität und -mortalität (2), ohne daß bisher eine eindeutige Therapie gefunden wurde. Die Schwierigkeit der Chemotherapie maligner Tumoren beruht hauptsächlich auf der Maskierung der Tumorzelle und dem geringen Grad der Fremdheit gegenüber normalen körpereigenen Zellen.
In der Tumortherapie werden heute alle drei Möglichkeiten der Therapie, nämlich Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie angewandt, wobei sich die jeweilige Anwendung nach der Art, Lokalisierung, Differenzierung und dem Stadium des Tumors richtet. In der letzten Zeit setzt sich die Kombination dieser drei Grundmethoden immer mehr durch.

Ein für die Chemotherapie bedeutendes Agens ist das Cyclophosphamid[1] aus der Gruppe der alkylierenden Zytostatika. Seine vorrangige Stellung ist begründet durch die Tumorselektivität bei gewissen schnell proliferierenden Tumoren (5, 6, 19) und durch den großen therapeutischen Index, der sich aus dem günstigen Verhältnis Dosis letalis zu Dosis curativa ergibt (5, 6, 4). Wie Hohorst und Brock zeigen konnten (5, 6), ist Cyclophosphamid in vitro chemisch stabil und zeigt keine zytostatische Wirkung. Das Zytostatikum wird im Organismus des Warmblüters, vorwiegend in der Leber, durch eine mischfunktionelle Oxidation microsomaler Enzymsysteme zu 4-Hydroxy-Cyclophosphamid aktiviert, das mit seinem Tautomeren Aldophosphamid im Gleichgewicht steht (54).

[1] Endoxan (R), Hersteller: ASTA-Werke AG., Bielefeld

Beide Produkte besitzen keine aktuelle alkylierende Aktivität. Die eigentliche Wirkform stellt vermutlich das starke Alkylans NH-Lost-Phosphorsäurediamid (N,N- Bis-(2- chloräthyl)- phosphorsäurediamid) dar, das durch Abspaltung von Acrolein aus Aldophosphamid in der Zelle entsteht.

Parallel zur Aktivierung laufen Deaktivierungsprozesse ab, die durch Dehydrierung des 4-Hydroxy-Cyclophosphamid zum stabilen 4-Keto-Cyclophosphamid führen, bzw. beim Aldophosphamid zum stabilen Carboxyphosphamid, die beide keine oder nur geringe zytostatische Aktivität besitzen.

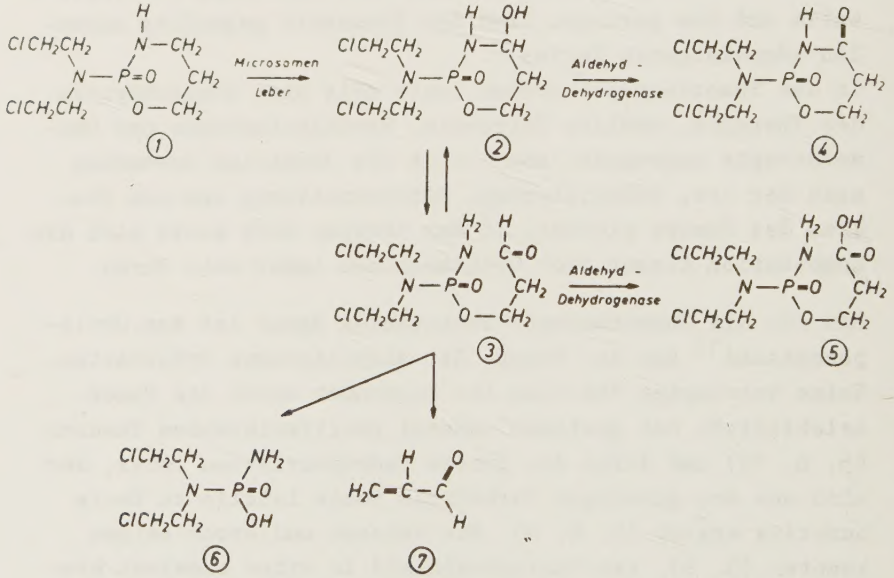


Abbildung 1: Aktivierung und Giftung von Cyclophosphamid in der Leber.

1) Cyclophosphamid
2) 4-Hydroxy-Cyclophosphamid
3) Aldophosphamid
4) 4-Keto-Cyclophosphamid (Endstufe)
5) Carboxyphosphamid (Endstufe)
7) Acrolein
6) NH-Lost-Phosphorsäurediamid

Die primären Aktivierungsprodukte des Cyclophosphamid wurden erst durch die von Takamizawa und Mitarbeitern (50, 51) ermöglichte Darstellung der 4-Hydroperoxy-Verbindung zugänglich, die in wässriger Lösung spontan in 4-Hydroxy-Cyclophosphamid zerfällt. Hierdurch wurde die weitgehende Aufklärung der Aktivierung und Metabolisierung von Cyclophosphamid (siehe Abbildung 1) ermöglicht (5,10,18,20,46).

Die Chemotherapie vor bzw. nach Bestrahlung, auch in Verbindung mit chirurgischen Eingriffen, gehört bereits zu den klassischen Methoden in der kombinierten Tumortherapie. Die Kombination von Strahlen- und Chemotherapie bietet sich bei entsprechenden Befunden vor allem für den Einsatz alkylierender Zytostatika an, da diese sogenannten radiomimetischen Substanzen wie die Radiotherapie vorwiegend in der S- und G_2-Phase der Zelle zur Wirkung kommen und somit additive Effekte den therapeutischen Erfolg begünstigen können. Eine solche lokale Vorbestrahlung eines Tumors mit entsprechenden Dosen kann die Möglichkeit einer Dosisreduzierung bei der nachfolgenden Chemotherapie eröffnen und damit die Gefahren akuter toxischer Nebenwirkungen entsprechend einschränken. Klinische Befunde zeigen in der Beurteilung des Erfolgs der angewandten Kombinationstherapie sowohl positive als auch negative Ergebnisse (3, 39). Auch entsprechende tierexperimentelle Untersuchungen führten zu widersprechenden Befunden (37).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einer orientierenden tierexperimentellen Studie, bei Anwendung radiochemischer und biochemischer Analysenverfahren zu prüfen, ob sich Anhaltspunkte für eine additive Wirkung von Bestrahlung und Chemotherapie ergeben.
Durch den Einsatz von hochspezifisch tritiiertem Cyclophosphamid war es möglich, über die nicht extrahierbaren Restkonzentrationen im Tumor und Begleitorgan einen Anhaltspunkt über die Größe der Reaktionen von Metaboliten des

Zytostatikums mit dem Gewebe zu erhalten. Bei einem Vergleich der alleinigen ^{3}H-Cyclophosphamid-Stoßtherapie mit der gleichen Therapie, jedoch unter Vorbestrahlung mit definierten Dosen an der tumortragenden Ratte, wurden folgende Parameter analysiert:

1. renale Ausscheidung an Cyclophosphamid und Metaboliten bis zum 5. Tag nach Applikation
2. Größe der Restkonzentration und ihr nicht extrahierbarer Anteil am 5. Tag nach Chemotherapie
3. DNS-Gehalt und RNS-Gehalt des Tumors
4. ^{14}C-Desoxy-Thymidin-Index
5. spezifische Alkylierung der DNS

In einem Vorversuch wurden zu verschiedenen Zeiten nach lokaler Bestrahlung des soliden Yoshida-Sarkoms an der Ratte mit 150 rad Röntgenstrahlung bis zu 15 Stunden p.r. die DNS- und Proteinsyntheseraten bestimmt, um einen Anhaltspunkt über einen möglichen Synchronisationseffekt zu erhalten und, um in Verbindung mit der Zykluszeit und der Dauer der S-Phase, einen günstigen Zeitpunkt für die Chemotherapie nach Bestrahlung zu finden.
Parallel zu diesen Untersuchungen wurden Überlebensversuche durchgeführt mit einer unbehandelten Kontrollgruppe, einer Gruppe nach Cyclophosphamid-Stoßtherapie und Gruppen, bei denen der Tumor vor der Chemotherapie lokal mit Dosen von 50 rad bis 500 rad bestrahlt worden war.

Über die Methodik und die Ergebnisse dieser Untersuchungen wird im folgenden berichtet.

II. MATERIAL UND METHODIK

1. Bestimmung der DNS- und Proteinsynthese nach lokaler Tumorbestrahlung bei der Ratte

16 weibliche tumortragende (solides Yoshida-Sarkom) Ratten (Sprague Dawley), mittleres Körpergewicht 125 g, wurden am 5. Tag nach Überimpfung des Tumors (0,5 ml Yoshida-Aszites-Suspension in den rechten Oberschenkel i.m.) lokal bestrahlt. Die lokale Bestrahlung erfolgte mit einem Röntgengerät RT 100, Fa. Müller, bei 85 kV für eine Zeit von 8,1 sec. entsprechend 150 rad, bei einem Tubusdurchmesser von 5 cm. Die Bestrahlung erfolgte unter leichter Äthernarkose der Tiere.

6, 9, 12 und 15 Stunden nach der Bestrahlung wurden jeweils 4 Tiere nach Herzpunktion in Äthernarkose durch Dekapitieren getötet. 2 Stunden vor Tötung erhielt jedes Tier der 4 Bestrahlungsgruppen und einer unbehandelten Kontrollgruppe (n = 4) 76,8 μCi ^{3}H-Desoxy-Thymidin und 23,0 μCi ^{14}C-L-Leucin i.v. in die linke Vena femoralis injiziert.

((methyl-^{3}H) Thymidin, spez. Aktivität 17 mCi/ m mol, radiochemische Reinheit 98 % Code TRK 120,

L- (1- ^{14}C) Leucin, spez. Aktivität 62 mCi/ m mol, radiochemische Reinheit 98 % Code CFA 273, Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig)

Der bestrahlte Tumor und der darunterliegende Muskel wurden sorgfältig herauspräpariert und Material vom kontralateralen Oberschenkelmuskel entnommen. Das Gewebe wurde im Eisbad mit einem Ultraturrax (Modell Tp 18 - 10, Firma Jahnke und Kunkel, Staufen i.Br.) homogenisiert und bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren.

Die Kontrolltiere wurden den Versuchstieren, mit Ausnahme der Bestrahlung, weitgehend gleich behandelt.

2. Chemotherapie mit ^{3}H-Cyclophosphamid mit und ohne lokale Vorbestrahlung des Tumors bei der Ratte

2.1 Charakterisierung des ^{3}H-Cyclophosphamid

Das verwendete ^{3}H-Cyclophosphamid war in einer mehrstufigen Synthese durch Tritiierung der NH-Lost-Gruppe (2-(Bis- (Cl- CHT- CHT) - N) - R) nach einem von Steiner und Mitarbeitern beschriebenen Verfahren (47) radioaktiv etikettiert worden. Die spezifische Aktivität betrug 0,7 mCi ^{3}H/ mg Cyclophosphamid bei einer radiochemischen Reinheit im Untersuchungszeitraum zwischen 94 % und 96 %.

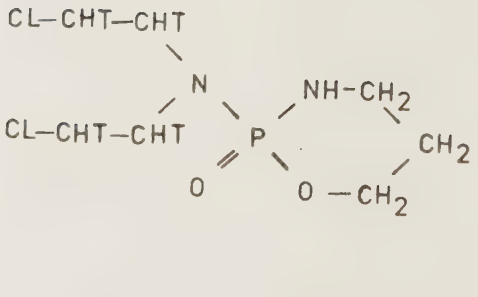


Abbildung 2: Strukturformel des tritiierten Cyclophosphamid

2.2 Tierexperiment

Weibliche tumortragende (solides Yoshida-Sarkom) Ratten (Sprague Dawley), mittleres Körpergewicht 145 g, wurden

am 5. Tag nach Überimpfung des Tumors in Gruppen zu je 5 Tieren mit Dosen von 150 rad, 300 rad und 500 rad lokal am Tumor in Äthernarkose bestrahlt (Tubusdurchmesser 5 cm, bei 85 kV, Bestrahlungszeiten von 8,1 sec, 16,2 sec und 27 sec).

8 Stunden nach Bestrahlung erhielten die Tiere der drei Gruppen und eine nicht bestrahlte Gruppe von 4 Tieren eine Dosis von 30 mg ^{3}H-Cyclophosphamid/kg Körpergewicht (2,7 mCi ^{3}H/Tier) in 0,3 ml wässriger Lösung in die Schwanzvene injiziert. Anschließend wurden die Tiere einzeln in Stoffwechselkäfige gesetzt, wodurch ein getrenntes quantitatives Sammeln von Urin und Kot garantiert war. Die Tumoren der Versuchstiere wurden täglich durch Tastbefund kontrolliert, sowie auch das Verhalten der Tiere (Haarverlust etc.) beobachtet. 2 Stunden vor Tötung erhielten die Tiere 10,2 μCi ^{14}C-Desoxy-Thymidin intravenös injiziert. Die Tiere wurden am 5. Tag nach ^{3}H-Cyclophosphamid-Applikation in Äthernarkose nach Herzpunktion durch Dekapitieren getötet. Der Tumor wurde sorgfältig ausgeschält und gewogen, sowie Probenmaterial aus dem Tumormuskel und dem kontralateralen Muskel des Oberschenkels entnommen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Organe tiefgefroren.

Die Sammlung der renalen Ausscheidungen erfolgte in 24-Stunden-Sammelfraktionen bis zu 120 Stunden (Aufbewahrung bis zur Aufbereitung bei minus 20 Grad Celsius).

3. Radiochemische und biochemische Probenaufbereitung

Chemikalien: Alle im folgenden aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen (Reinheitsgrad p.a.), Szintillationschemikalien von der Firma W. Zinnser, Frankfurt.

Die Bestimmung der Utilisation von ^{3}H-Thymidin und ^{14}C-Leucin 6, 9, 12 und 15 Stunden nach einmaliger Bestrahlung mit 150 rad in den untersuchten Geweben erfolgte in extrahierten aliquoten Teilen der Organe (70 - 100 mg Organ, extrahiert zweimal mit 3 ml 7%-iger $HClO_4$ und zweimal mit 3 ml physiologischer NaCl-Lösung). Von den nach Zentrifugieren bei 4° Celsius (Kühlzentrifuge MSE Firma Colora, Lorch) vereinigten Dekantaten wurden je 1 ml (paralleler Ansatz) in Meßfläschchen pipettiert, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Unisolv I) versetzt und zur Radioaktivitätsbestimmung auf ^{3}H- und ^{14}C-Aktivitäten gebracht (freie Vorläufer).
Die extrahierten Rückstände wurden quantitativ auf Filterpapier übertragen, gefriergetrocknet (GT II, Firma Leybold) und in einem Verbrennungsautomaten (Modell 305, Sample Oxidicer, Firma Packard) zu $^{3}H_2O$ und $^{14}CO_2$ verbrannt und nach getrennter Aufnahme bzw. Absorption beider Verbindungen in den vorgelegten Szintillationslösungen zur Radioaktivitätsbestimmung gebracht. Das Gerät wurde auf Effektivität durch Verbrennen von Standardproben überprüft und memory-Effekte durch Leerverbrennungen weitgehend ausgeschaltet.

Zur Bestimmung der Konzentrationen an Cyclophosphamid und äquimolaren Metaboliten über die ^{3}H-Aktivität in Urin und Serum der Tiere nach der Chemotherapie mit und ohne Vorbestrahlung wurden jeweils 0,1 ml in parallelem Ansatz vor und nach Gefriertrocknung in 0,5 ml Hyamin-hydroxid aufgenommen und mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit (5,5 g PPO + 0,1 g POPOP + 0,2 l Äthanol + Toluol ad 1 l) versetzt.

Durch die Bestimmung der ^{3}H-Aktivitäten vor und nach Gefriertrocknung konnte der Anteil an $^{3}H_2O$ als Stoffwechselendprodukt der tritiierten Chloräthylgruppen erfaßt werden.
Die Organe Tumor, Tumormuskel und Muskel wurden mit einem Wiegemesser zerkleinert, alquote Teile mit dem Ultraturrax homogenisiert. Aliquote Mengen dieser Homogenate wurden zur Bestimmung der Konzentrationen an ^{3}H und ^{14}C (Cyclophosphamid und Desoxy-Thymidin) auf Filterpapier eingewogen und im Verbrennungsautomaten nach Gefriertrocknen analysiert.

Zur Ermittlung des DNS- und RNS-Gehaltes wurde Tumorgewebe nach der von Kayser beschriebenen Methode (21) aufbereitet. Nach Poolen von Aliquots der mit dem Wiegemesser zerkleinerten Tumoren der Tiere einer Therapiegruppe wurden jeweils 100 mg in 6 ml entsalztem Wasser im Eisbad gepottert (Glaspotter, Firma Braun, Melsungen) und nach Zusatz von 3 ml 0,6 n $HClO_4$ in einer Kühlzentrifuge (MSE 18 Highspeed, Firma Colora) 20 min bei 3000 UpM zentrifugiert. Die Extraktion von freien Vorläufern nicht gebundener Cyclophosphamid-Metaboliten und von extrahierbarem biologischen Material wurde insgesamt 6-mal mit 3 ml 0,2 n $HClO_4$ in Kälte wiederholt. Die Zentrifugenröhrchen mit dem Rückstand wurden so aufgestellt, daß restliches Lösungsmittel ablaufen konnte und dann im Kühlschrank bei 4° Celsius über Nacht aufbewahrt. Die Dekantate wurden verworfen.
Der Rückstand wurde mit 3 ml 1 n KOH versetzt und nach Hydrolyse bei 37° Celsius über 60 Minuten und anschließendem Abkühlen, durch Zugabe von 2 ml kalter 2 n $HClO_4$ neutralisiert und 20 Minuten bei 3000 UpM bei 4° Celsius zentrifugiert. Nach nochmaligem Nachwaschen mit 3 ml und 2 ml 0,1 n $HClO_4$ wurden alle drei Dekantate, die die RNS-Nukleotide enthielten, vereinigt und zur weiteren Analyse bereitgehalten.
Nach Resuspension des Rückstandes in 2 ml 1 n $HClO_4$ erfolgte eine Inkubation bei 70° Celsius über 30 Minuten und an-

schließende Zentrifugation. Die Behandlung des Rückstandes wurde unter gleichen Bedingungen bei Inkubation über 10 Minuten wiederholt. Beide Überstände mit den DNS-Nukleotiden wurden vereinigt und zu weiteren Analysen bereitgehalten.

Jeweils 1 ml der Hydrolysate der DNS- und RNS-Extrakte wurden zur Bestimmung der Radioaktivität in Szintillationsfläschchen pipettiert und mit 10 ml Unisolv I versetzt und im Flüssig-Szintillationsspektrometer gemessen. Aliquote Teile der Rückstände, Membranen, Proteine und subzelluläre Bestandteile enthaltend, wurden nach 3maligen Nachwaschen mit jeweils 3 ml entsalztem Wasser auf Filterpapier gewogen, gefriergetrocknet, im Verbrennungsautomaten verbrannt und anschließend auf ^{3}H- und ^{14}C-Aktivität analysiert.
Die quantitative Bestimmung der DNS erfolgte durch Photometrie in Anlehnung an das von Chandra (8) beschriebene Verfahren. Die DNS-Konzentrationen der entsprechenden Hydrolysefraktionen wurden photometrisch mit Hilfe der Diphenylaminfarbreaktion bei 600 nm, 1,0 cm Schichtdicke und 3 ml Testvolumen bestimmt. Dazu wurden nacheinander 0,2 ml Probenlösung, 0,8 ml 0,5 n $HClO_4$ und 2 ml einer Diphenylaminreagenzlösung (20 g Diphenylamin in 100 ml Eisessig, 1,5 % H_2SO_4 und 16 mg Acetaldehyd in 1 ml entsalztem Wasser, Mischungsverhältnis 200:1) in Teströhrchen gut gemischt und 20 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Messung der Extinktion (Spektralphotometer PM 6, Firma Zeiss) erfolgte gegen wässrige Diphenylamin-$HClO_4$-Lösung. Die DNS -Konzentration wurde aus einer vorher erstellten Eichkurve abgelesen. Sie umfaßte den Bereich von 2 - 50 μg DNS/ml und war aus einer DNS-Stammlösung von hydrolysierter DNS aus Heringssperma (Firma Serva, Heidelberg) erstellt worden. Um auf eventuelle Proteingehalte zu kontrollieren, erfolgten Kontrollmessungen der gleichen Ansätze ohne Farbreaktion mit Diphenylamin bei 265 nm und 232 nm.
Die Bestimmung des RNS-Gehaltes der RNS-Fraktion erfolgte photometrisch bei 276 nm, 1,0 cm Schichtdicke (Quarz-

küvetten) und 3 ml Testvolumen, bestehend aus 0,2 ml Probenlösung und 2,8 ml 0,1 n $HClO_4$. Gemessen wurde gegen eine wässrige $HClO_4$-Lösung (0,2 ml H_2O + 2,8 ml 0,1 n $HClO_4$) (9). Die Konzentrationswerte wurden durch Kalibrierung der Extinktionen aus einer vorher aus RNS aus Kälberthymus (Firma Serva, Heidelberg) erstellten Eichkurve ermittelt.

Radiochromatographie:

Aliquots von Organhomogenaten wurden 3mal mit 50%igem Methanol (2 % Trichloressigsäure) in der Kälte extrahiert. Die bei 4° Celsius nach Zentrifugation gewonnenen Dekantate wurden vereinigt, und diese Extrakte der Gewebe der Tiere einer Dosisgruppe gepoolt, gefriergetrocknet und im kleinstmöglichen Volumen 50%igen Methanols aufgenommen und anschließend chromatographiert.
Die Urinsammelfraktionen der jeweiligen Dosisgruppe wurden nach Poolen ohne weitere Vorbehandlung einer chromatographischen Analyse unterzogen.
50 µl der gepoolten Organextrakte und der Urinsammelfraktionen wurden auf Dünnschichtplatten (DC-Fertigplatten, Kieselgel 60/Kieselgur F 254, Schichtdicke 0,25 mm, schnelllaufend, Firma E. Merck, Darmstadt) aufgetragen und im Laufmittelgemisch I (n-Butanol : Methyläthylketon : H_2O : Methanol = 4 : 2 : 3 : 1) bis zu einer Laufmittelfront von 9 cm ca. 90 Minuten bei 4° Celsius chromatographiert. Nach Lufttrocknen der Platten bei Zimmertemperatur wurden die mit der Laufmittelfront laufenden lipophilen Substanzen mit dem Laufmittel II (Aceton : Chloroform = 2 : 1) bis zu einer Laufmittelfront von 17 cm ca. 40 Minuten ebenfalls in Kälte aufgetrennt.
Nach Lufttrocknen der Platten wurde mit einem halbautomatischen Gerät die Schicht in 0,2 cm breiten Streifen in Meßfläschchen abgeschabt, die dann mit 10 ml Szintillationslösung (22 g Cabosil + 5,5 g PPO + 0,1 g POPOP + 0,1 l Methanol + Toluol ad 1 l) versetzt und zur Aktivitätsbestimmung gebracht wurden.

Radioaktivitätsbestimmung:

Die ^{3}H- und ^{14}C-Radioaktivitätsbestimmung (Doppelmarkierung, ^{3}H-Cyclophosphamid und ^{14}C-Desoxy-Thymidin, bzw. im Vorversuch ^{3}H-Desoxy-Thymidin und ^{14}C-L-Leucin) erfolgte im 3-Kanal-Flüssig-Szintillationsspektrometer (Modell 3380 und 3390, Firma Packard) mit automatischer Korrektur der Löscheffekte über das Kanalverhältnis des externen Standards und Ausdruck der Daten in absoluter Aktivität (dpm).

Für die verschiedenen Szintillationslösungen mit unterschiedlichem biologischen Probenmaterial wurden die Quenchbereiche mit internem Standard (^{3}H-Toluol, ^{14}C-Toluol) im Untersuchungszeitraum laufend kontrolliert. Die Meßzeiten waren so gewählt, daß der mittlere Fehler der Einzelmessung unter 2 % lag.

4. Bestimmung der Überlebenszeiten in der kombinierten Strahlen- und Cyclophosphamid-Therapie

Bei weiblichen tumortragenden Ratten (solides Yoshida-Sarkom, Oberschenkel), mittleres Körpergewicht 165 g, wurden am 4. Tag nach Tumorüberimpfung in Gruppen von je 10 Tieren die Tumoren mit Dosen von 50 rad, 150 rad und 500 rad lokal bestrahlt. 8 Stunden nach Bestrahlung erhielten die Tiere aller Bestrahlungsgruppen und eine Kontrollgruppe (n = 10) eine i.p. Dosis von 30 mg Cyclophosphamid/kg Körpergewicht. Zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrollgruppe (n = 10) in Käfigen bei gleicher Fütterung mit Trockenfutter (Altromin-Standardfutter) und Wasser ad libidum im Tierstall bei einer Temperatur von 22 - 25° Celsius gehalten. Zunächst wurden von den einzelnen Versuchs- und Kontrolltieren 2 Tiere in Käfigen zusammengesetzt, später, nach beginnendem Absterben der Tiere, wurde die Einzelhaltung vorgezogen.
Die regelmäßige Kontrolle der Tiere erfolgte auf äußeres Verhalten, Reaktion (struppiges Fell, Haarverlust etc.) und Wachstum des Tumors auf Augenschein und Tasten. Nach dem Exitus der Tiere erfolgte die Feststellung der Metastasierung; das Ausmaß des Tumors wurde optisch und die Tumorgewichte cavimetrisch nach Obduktion bestimmt.

5. Auswertung der Ergebnisse

Die gemittelten parallelen Analysenergebnisse der ^{3}H- und ^{14}C-Analysen (Cyclophosphamid und Desoxy-Thymidin) wurden auf spezifische Aktivität (dpm/g bzw. dpm/ml) umgerechnet und zur Korrektur der unterschiedlichen Körpergewichte (KG) bei gleicher Dosierung die relativen Konzentrationen (%) nach der Formel

$$\text{rel. Konz.} = \frac{\text{spez.Aktivität (dpm/ml bzw. g) x KG (g) x 100}}{\text{Aktivitätsdosis (dpm)}} \%$$

berechnet. Somit entsprechen 100 % relativer Konzentration der pro g bzw. kg applizierten Dosis in g bzw. mg an Cyclophosphamid bzw. äquimolaren Metaboliten.
100 % der relativen Konzentrationen in der Bestimmung der Protein- bzw. DNS-Synthese entsprechen den pro g Tier applizierten ^{14}C- bzw. ^{3}H-Aktivitätsdosen in dpm. Die Ergebnisse der ^{3}H-Aktivitätsbestimmung in den Urinsammelfraktionen wurde auf prozentuale Dosisanteile an Cyclophosphamid bzw. Metaboliten umgerechnet.
Aus den Analysenergebnissen von Serum und Urin ohne und nach Gefriertrocknen wurde die Menge an entstandenem Tritiumwasser als Endprodukt des Stoffwechsels der tritiierten Chloräthylgruppen berechnet, wobei von einem Körperwasseranteil von 60 % des Körpergewichtes ausgegangen wurde.
Bei Tötung der mit ^{3}H-Cyclophosphamid behandelten Tiere wurden die Tumoren gewogen und die Mittelwerte und Standardabweichungen einzelner Gruppen errechnet.
In den Radiochromatogrammen wurden die Summen der Aktivitätsgipfel, ihr prozentualer Anteil an der aufgetragenen Radioaktivität, sowie die Rf-Werte berechnet. Die Resultate aus den parallel gefahrenen Chromatogrammen wurden gemittelt.

Die Ergebnisse der Analysen aus den Organextrakten wurden in ihrer prozentualen Verteilung wiedergegeben, die Ergebnisse in den Urinsammelfraktionen auf prozentuale Dosisan-

teile für Cyclophosphamid und die über ihre Rf-Werte charakterisierten Abbauprodukte berechnet.
Aus den ^{3}H-Aktivitätsbestimmungen in den RNS- und DNS-extrakten der analysierten Organe wurden die Konzentrationen in relativen Größen (%) berechnet. 100 % relative Konzentration für die DNS-Fraktion bedeutet, daß 30 µg bzw. 0,1 µmol Metabolite des Cyclophosphamid mit der 1 g Organ enthaltenen DNS reagiert haben. In den DNS-Extrakten und im Rückstand konnten bis zu maximal 10 % der ^{14}C-Aktivität analysiert werden. Da es sich hierbei um durch Utilisation von ^{14}C-Desoxy-Thymidin markierte DNS handelt, erfolgte die erforderliche Korrektur für den DNS-Gehalt und die relativen Konzentrationen (%) an ^{3}H-Cyclophosphamid im DNS-Extrakt aus den spezifischen ^{3}H- und ^{14}C-Aktivitäten der DNS. Aus den relativen Konzentrationen (%) und den Gehalten an Nukleinsäure (mg/g) erfolgte die Berechnung der spezifischen Alkylierungen (nmol ^{3}H-Cyclophosphamid-Metabolite/mg Nukleinsäure). Unter Bezug auf die molaren Konzentrationen wurde die Anzahl der Nukleotide pro Einzelalkylierung ermittelt.
Bei Berechnung der Desoxy-Thymidin- und der Leucin-Indices (Inkorporations- und Utilisations-Indices) wurden die Mittelwerte der relativen Konzentrationen in den analysierten Organen der Kontrollgruppe gleich 100 % gesetzt und für die Versuchsgruppen (Bestrahlung, Cyclophosphamid-Therapie) die entsprechenden Indices für diese Organe auf der Basis des 100 %-Wertes der Kontrollen errechnet.
Aus den Ergebnissen der einzelnen Analysen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet, Unterschiede in den Mittelwerten zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des inhomogenen t-Test nach Student auf biologische Signifikanz überprüft.

III. ERGEBNISSE

1. Protein- und DNS-Synthese, sowie Inkorporation von Synthese-Vorläufern im Muskel, Tumormuskel und Tumor zu verschiedenen Zeiten nach lokaler Tumorbestrahlung

Um eine Aussage über einen optimalen Zeitpunkt der Chemotherapie mit Cyclophosphamid nach lokaler Vorbestrahlung zu erhalten wurde in einem Vorversuch durch Applikation von ^{14}C-L-Leucin und ^{3}H-Desoxy-Thymidin 2 Stunden vor Tötung der Tiere zu den Zeitpunkten 6, 9, 12 und 15 Stunden nach Bestrahlung die Einbaurate an ^{14}C-Leucin und ^{3}H-Desoxy-Thymidin ermittelt.

In Tabelle 1 sind die relativen Gesamtkonzentrationen (%) (freies und utilisiertes ^{14}C-Leucin) und die an utilisiertem Leucin (%) in Tumor, Tumormuskel und kontralateralem Muskel der Ratte zu verschiedenen Zeiten nach lokaler Bestrahlung des Tumors mit 150 rad Röntgenstrahlung als Mittelwerte ($M \pm S$) wiedergegeben.
Bei der Kontrollgruppe und bei den verschiedenen Zeitgruppen nach Bestrahlung zeigten sich bei der Leucin-Utilisation im kontralateralen Muskel keine erkennbaren Tendenzen in den Konzentrationsgrößen. Im Gegensatz zum Skelettmuskel wies der Tumormuskel eine um das 4-fach höhere Leucin-Utilisation auf, jedoch zeigte sich auch hier zwischen den Kontrolltieren und den lokal bestrahlten Tieren kein Unterschied in den Utilisationsgrößen. Die Utilisation an ^{14}C-Leucin im Tumor zeigte deutliche Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Bestrahlungsgruppen, wobei die relative Konzentration der unbestrahlten Gruppe einen Wert von $203{,}68 \pm 18{,}51$ % aufwies, während die Behandlungsgruppen zum Teil signifikant niedrigere Werte, am deutlichsten die 9-Stunden-Gruppe (mit $128{,}05 \pm 13{,}06$ %, $p < 0{,}01$), hatten. Die relativen Gesamtkonzentrationen zeigten eine deutliche Permeationshemmung im Tumor gegenüber der Kontrollgruppe, wobei der Unterschied

zur Kontrollgruppe bei der 9-Stunden-Gruppe mit einem Wert von 141,50 ± 12,65 % am deutlichsten signifikant war ($p < 0{,}001$). In den einzelnen Zeitgruppen untereinander ergaben sich im Tumor keine signifikanten Unterschiede in der relativen Gesamtkonzentration. In den Organen Tumormuskel und Skelettmuskel ließ sich keine Permeationshemmung gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen.
Die Indices für die Utilisation und die Inkorporation von ^{14}C-Leucin sind in Tabelle 2 angegeben, wobei die relativen Konzentrationen der Kontrollgruppe (unbestrahlt) gleich 100 % gesetzt wurden. Hieraus wird das vorher über Kontroll- und Bestrahlungsgruppen Gesagte in bezug auf das jeweilige Gewebe noch verdeutlicht.
Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß unter der Bestrahlung mit 150 rad ein Einfluß auf die Permeabilität, d.h. die Inkorporation von Leucin stattgefunden hat. Die relative Gesamtkonzentration als Ausdruck für die Größe der Permeation zeigte eine deutliche Permeationshemmung in allen Zeitgruppen im Tumor gegenüber der Kontrolle. Mit Ausnahme der 12-Stunden-Bestrahlungsgruppe waren die Utilisationsgrößen (Proteinsyntheseraten) zu den anderen Zeitpunkten nach Bestrahlung im Tumor signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Dies zeigt deutlich an, daß die Bestrahlung zu einer Depression der Proteinsynthese geführt hat; spezielle Aussagen über die einzelnen Zeitgruppen können nicht gemacht werden, da die Unterschiede als zufällig anzusehen sind.

In Tabelle 3 sind die relativen Konzentrationen (%) an Gesamt-Desoxy-Thymidin und an in der DNS-Synthese utilisiertem Desoxy-Thymidin in Tumor, Tumormuskel und kontralateralem Muskel der Ratte zu verschiedenen Zeiten nach lokaler Bestrahlung des Tumors mit 150 rad Röntgenstrahlung als Mittelwerte (M ± S) wiedergegeben.
Im kontralateralen Muskel zeigten sich in der Utilisation von ^{3}H-Desoxy-Thymidin keine Konzentrationsunterschiede

zwischen den verschiedenen Zeitgruppen und der Kontrollgruppe. Im Gegensatz zum Skelettmuskel wies der Tumormuskel durchweg signifikant höhere Konzentrationsgrößen (um das 30 - 40fache) auf, jedoch lassen sich auf Grund der hohen Standardabweichungen keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen absichern. Die Tendenz ging aber zu niedrigeren ^{3}H-Desoxy-Thymidin-Einbauraten im zeitlichen Verlauf. Die Utilisation von ^{3}H-Desoxy-Thymidin im Tumor zeigte deutliche Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Bestrahlungsgruppen. Alle Zeitwerte lagen niedriger als die Kontrollgruppe, jedoch ohne biologische Signifikanz mit Ausnahme des 15 h-Wertes ($p < 0{,}025$). Auch die deutliche Tendenz der abnehmenden Utilisation von ^{3}H-Desoxy-Thymidin im zeitlichen Verlauf muß wegen fehlender Absicherung der Unterschiede zwischen den Zeitwerten als zufällig erachtet werden.

Die relativen Gesamtkonzentrationen als Ausdruck für die Größe der Permeation von ^{3}H-Desoxy-Thymidin zeigte im Tumor eine deutliche Permeationshemmung in allen Zeitgruppen gegenüber der Kontrolle. Die relative Gesamtkonzentration betrug im Tumor bei der 15 h-Gruppe $173{,}59 \pm 23{,}81$ %. Der Unterschied zur Kontrolle war mit $p < 0{,}02$ von allen Zeitgruppen am deutlichsten signifikant. Eine Absicherung der Unterschiede der einzelnen Zeitgruppen im Tumor war nicht möglich, da die Unterschiede als zufällig angesehen werden müssen. Im Tumormuskel und Skelettmuskel lagen die Inkorporationsgrößen in gleichen Größenordnungen ohne signifikante Unterschiede.

Die Indices für die Inkorporation und die Utilisation von ^{3}H-Desoxy-Thymidin sind aus Tabelle 4 ersichtlich, wobei die relativen Konzentrationen der Kontrollgruppe gleich 100 % gesetzt wurden. Die Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Zeitgruppen der bestrahlten Tiere stellen sich in diesen Ergebnisdaten noch deutlicher dar. Die Utilisationsgrößen (DNS-Syntheseraten) 6 bis 15 Stunden nach Bestrahlung lagen im Tumor niedriger, signifikant jedoch

nur für die 15 h-Gruppe. Dies zeigt deutlich, daß die Bestrahlung zu einer Depression der DNS-Synthese, aber auch zu einer Permeationshemmung im Tumor geführt hat.

Im Hinblick auf den günstigsten Zeitpunkt für den Einsatz von Cyclophosphamid nach Bestrahlung läßt sich aus der Protein- und DNS-Synthese bei den einzelnen Zeitgruppen keine konkrete Aussage machen, da es zwar im Gegensatz zur Kontrollgruppe zu einer Depression, aber anscheinend zu keiner signifikanten Blockade der S- und G_2-Phase durch die eingesetzte Strahlendosis kommt. Maßgebend für den zeitlichen Einsatz des Zytostatikums nach Bestrahlung wurde daher die Zykluszeit des Tumors von 21 Stunden (22) mit einer S-Phasendauer von 10 Stunden. Bei einer abgeschlossenen Verteilung der injizierten Zytostatikadosis im Zeitraum von 30 min bis zu 1 h und einer wertbaren Aktivierung und Reaktivität zytostatischer und zytotoxischer Metabolite bis zu 4 h p.i. (6,7,41) und sehr wahrscheinlich durch Repairvorgänge verlängerten Zykluszeiten der strahlengeschädigten Zellen (52), sowie der Möglichkeit eines vermehrten Recruitments (22) aus der G_0-Phase, entschlossen wir uns zur Stoßtherapie mit Cyclophosphamid 8 h nach Bestrahlung.

Ob die unter der Bestrahlung im Tumor analysierte, deutlich verminderte Utilisation von L-Leucin und Desoxy-Thymidin mit der eingeschränkten Inkorporation in Zusammenhang gebracht werden muß, kann nicht beurteilt werden.

Tabelle 1

Utilisations- und Inkorporationsgrößen in relativen Konzentrationen (%) an ^{14}C-L-Leucin in Tumor, Tumormuskel und Muskel der Ratte (n=4) zu verschiedenen Zeiten nach lokaler Tumorbestrahlung mit 150rad /85kV Röntgenstrahlung (M ± s)

Zeit nach Bestrahlung	Utilisation in rel. Konz. %			Inkorporation in rel. Konz. %		
	Tumor	Tumormuskel	Muskel	Tumor	Tumormuskel	Muskel
unbestrahlte Kontrolle (n=4)	203,68 ±18,51	122,67 ±29,82	29,31 ± 7,08	218,24 ±17,13	148,15 ±30,83	34,83 ± 6,61
6 Stunden	134,61 ±25,78	106,25 ± 6,35	23,47 ± 4,34	151,93 ±28,55	132,22 ± 7,22	30,91 ± 4,63
9 Stunden	128,05 ±13,06	113,16 ±24,75	45,17 ±12,54	141,50 ±12,65	134,60 ±24,61	51,07 ±12,99
12 Stunden	146,33 ±50,61	96,44 ±13,66	34,96 ± 8,58	134,98 ±27,13	123,56 ±14,18	40,07 ± 8,84
15 Stunden	137,29 ±20,91	117,50 ±14,85	26,71 ± 4,13	149,87 ±22,16	139,55 ±15,16	31,63 ± 4,16

Tabelle 2

Utilisations- und Inkorporations-Indices von ^{14}C-L-Leucin in Tumor, Tumormuskel und Muskel der Ratte (n=4) zu verschiedenen Zeiten nach lokaler Tumorbestrahlung mit 150rad/ 85kV Röntgenstrahlung (M ± s)

Zeit nach Bestrahlung	Utilisationsindex %			Inkorporationsindex %		
	Tumor	Tumormuskel	Muskel	Tumor	Tumormuskel	Muskel
unbestrahlte Kontrolle (n=4)	100 ± 9	100 ±24	100 ±24	100 ± 8	100 ±21	100 ±19
6 Stunden	66 ±19	87 ± 6	80 ±18	70 ±13	89 ± 5	89 ±13
9 Stunden	63 ±10	92 ±22	154 ±28	65 ± 6	91 ±17	147 ±37
12 Stunden	72 ±39	79 ±14	119 ±25	62 ±12	83 ± 9	115 ±25
15 Stunden	67 ±15	96 ±13	91 ±15	69 ±10	94 ±10	91 ±12

Tabelle 3

Utilisations- und Inkorporationsgrößen in relativen Konzentrationen (%) an ^{3}H-Desoxy-Thymidin in Tumor, Tumormuskel und Muskel der Ratte (n=4) zu verschiedenen Zeiten nach lokaler Tumorbestrahlung mit 150rad/ 85kV Röntgenstrahlung (M ± s)

Zeit nach Bestrahlung	Utilisation in rel. Konz. %			Inkorporation in rel. Konz. %		
	Tumor	Tumormuskel	Muskel	Tumor	Tumormuskel	Muskel
unbestrahlte Kontrolle (n=4)	219,86 ±36,61	250,39 ±74,13	3,95 ±1,48	260,48 ±41,60	333,29 ±44,68	49,08 ±6,26
6 Stunden	144,89 ±22,63	231,05 ±65,80	4,91 ±1,67	202,06 ±28,16	311,67 ±57,07	56,38 ±9,53
9 Stunden	131,30 ±53,28	187,03 ±57,89	3,70 ±1,40	190,56 ±34,70	292,95 ±15,18	50,20 ±4,89
12 Stunden	118,67 ±52,29	169,57 ±40,93	2,87 ±1,07	179,71 ±53,53	256,11 ±68,14	55,58 ±3,27
15 Stunden	115,50 ±21,39	133,17 ±46,19	3,26 ±0,73	173,59 ±23,81	222,09 ±69,98	54,02 ±1,98

Tabelle 4

Utilisations- und Inkorporations-Indices von ^{3}H-Desoxy-Thymidin in Tumor, Tumormuskel und Muskel der Ratte (n=4) zu verschiedenen Zeiten nach lokaler Tumorbestrahlung mit 150rad/ 85kV Röntgenstrahlung (M ± s)

Zeit nach Bestrahlung	Utilisationsindex %			Inkorporationsindex %		
	Tumor	Tumormuskel	Muskel	Tumor	Tumormuskel	Muskel
unbestrahlte Kontrolle (n=4)	100 ±17	100 ±30	100 ±37	100 ±16	100 ±13	100 ±13
6 Stunden	66 ±16	92 ±28	124 ±34	78 ±11	94 ±17	115 ±19
9 Stunden	60 ±27	75 ±31	94 ±38	73 ±13	88 ± 4	102 ±10
12 Stunden	54 ±44	68 ±24	73 ±37	69 ±20	77 ±19	113 ± 7
15 Stunden	53 ±19	53 ±35	83 ±22	67 ± 9	67 ±20	110 ± 4

2. Renale Ausscheidung an ^{3}H-Cyclophosphamid und Metaboliten bis zu 5 Tagen nach i.v. Applikation mit und ohne lokale Tumorvorbestrahlung

Die Ergebnisse der Analysen in den renalen Sammelfraktionen einschließlich der chromatographischen Aufschlüsselung bis zu 120 h nach i.v. Applikation von 30 mg ^{3}H-Cyclophosphamid/kg Körpergewicht mit und ohne lokale Vorbestrahlung mit unterschiedlichen Dosen sind aus der Tabelle 5 ersichtlich. Aufgeführt sind die in den 24 h-Sammelfraktionen und insgesamt bis zu 120 h p.i. ermittelten Gesamtausscheidungen (M $\pm$ S) und deren Differenzierung auf Cyclophosphamid und die über ihre Rf-Werte charakterisierten Metabolite in % der Dosis. In dem von Schaumlöffel und Mitarbeitern (41) angegebenen 2-phasigen Chromatographiesystem werden durch ein polares Laufmittel die mehr hydrophilen (Rf 0 - Rf 0,55) und durch ein mehr unpolares die mehr lipophilen Substanzen (Rf 0,55 - Rf 0,95) aufgetrennt. Einige Radioaktivitätsgipfel, die nur vereinzelt und mit sehr niedrigen prozentualen Anteilen an der aufgetragenen Radioaktivität auftraten, wurden in den Ergebnissen nicht berücksichtigt und ihr Anteil bei der Auswertung der Chromatogramme dem nächstliegenden Aktivitätsgipfel zugeordnet. Bedingt durch die zeitaufwendige Probenaufbereitung und die Instabilität bzw. Reaktivität konnten in dem angewendeten Chromatographiesystem die primären Aktivierungsprodukte 4-Hydroxy-Cyclophosphamid/Aldophosphamid, sowie die vermutliche Wirkform NH-Lost-Phosphorsäurediamid mit seiner hohen alkylierenden Aktivität nicht nachgewiesen werden. Die durch Dehydrierungen gebildeten stabilen Entgiftungsprodukte 4-Keto-Cyclophosphamid und Carboxyphosphamid wurden unter den Rf-Werten 0,6 und 0,5 sicher nachgewiesen.
Über die unter den jeweiligen Rf-Werten analysierten Substanzen werden folgende Aussagen gemacht (41):

Rf 0 : Nicht auftrennbare Substanzen, bestehend aus Reaktionsprodukten primärer und sekundärer Metabolite mit niedrigmolekularen biogenen Partnern (z.B. Glutathion)

Rf 0,1-0,2: Über die Struktur dieser Substanzen liegen keine Anhaltspunkte vor, eventuell sind dies Hydrolyseprodukte primärer Abbaustufen des Cyclophosphamid oder auch Derivate von freigesetztem NH-Lost oder NH-Lost-Phosphorsäurediamid

Rf 0,3 : Stabiler Metabolit, identifiziert als Reaktionsprodukt von 4-Hydroxy-Cyclophosphamid mit einer Mercapto-Verbindung (32,12,53)

Rf 0,4 : Konjugat von NH-Lost-Phosphorsäurediamid mit einem höhermolekularen Biomolekül

Rf 0,5 : Carboxyphosphamid

Rf 0,55: Über die Struktur dieser Substanz liegen keine Anhaltspunkte vor

Rf 0,6 : 4-Keto-Cyclophosphamid

Rf 0,7 : Cyclophosphamid, in sauren Urinproben eventuell zusätzlich ein Diastereomeres des 4-Hydroxy-Cyclophosphamid

Rf 0,8 : Höchstwahrscheinlich ein Derivat des Cyclophosphamid mit intaktem Oxazaphosphorinring

Rf 0,9 : Über die Struktur dieser Substanz können keine Aussagen gemacht werden.

Die Metabolite Rf 0,3, 0,4 und 0,5 können aufgrund ihrer positiven Reaktion mit 4- (4-Nitrobenzyl)- pyridin als potentielle Alkylantien angesehen werden. Eine zytostatische Wirkung kann ihnen nicht zugeschrieben werden (42).

In der Gesamtausscheidung bis 120 h p.i. zeigten die Gruppen mit und ohne lokale Vorbestrahlung gleich hohe renale Eliminationsgrößen von ca. 65 % der Dosis, wobei die mit 500 rad lokal vorbestrahlte Gruppe zu geringfügig höheren Ausscheidungswerten tendierte. Aufgrund der starken Streuung

lag jedoch keine Signifikanz vor. Da die renalen Ausscheidungsgrößen an Cyclophosphamid und Metaboliten in allen Versuchsgruppen weitgehende Übereinstimmung zeigten, werden diese Ergebnisse gemeinsam besprochen.
Bis zu 24 h p.i. wurden von allen Gruppen mehr als 90 % der insgesamt bis zu 120 h p.i. ausgeschiedenen Substanzmengen renal eliminiert. Die renale Elimination kann somit 24 h p.i. als abgeschlossen betrachtet werden. Unter Einbeziehung der Konzentrationsgrößen an Cyclophosphamid und Metaboliten der enteralen Ausscheidung bis 120 h, wie sie aus Arbeiten von Schaumlöffel und Mitarbeitern hervorgehen (41), ergaben sich Gesamtausscheidungsgrößen von 73 - 81 % der Dosis.
Berücksichtigt man noch die in Urin und Körperwasser analysierte Bildungsrate an Tritiumwasser als Stoffwechselendprodukt der tritiierten Chloräthylgruppen, die für die einzelnen Gruppen zwischen 9,7 und 11,0 % der Dosis lagen, so erhöhen sich die Ausscheidungs- und Abbauraten für Cyclophosphamid auf etwa 84 % bzw. 91 % der Dosis.
Mit Ausscheidungsgrößen von etwa 20 % der Dosis in allen Versuchsgruppen wurde Carboxyphosphamid (Rf 0,5) als Hauptmetabolit des Cyclophosphamid gekennzeichnet. Cyclophosphamid (Rf 0,7) wurde mit vergleichsweise hohen Dosisanteilen von etwa 15 % ausgeschieden; das unveränderte Zytostatikum konnte in allen Sammelfraktionen chromatographisch nachgewiesen werden. Auch der stark lipophile Metabolit Rf 0,8 wurde noch mit einem hohen Anteil von 6 - 7 % in allen Gruppen ausgeschieden.

Unter unseren Versuchsbedingungen, d.h. unter lokaler Vorbestrahlung des Tumors mit verschiedenen Dosen zeigte sich gegenüber der Monotherapie mit Cyclophosphamid kein Unterschied in den Ausscheidungsgrößen an Cyclophosphamid selbst und den über ihre Rf-Werte charakterisierten Substanzen, so daß ein Einfluß der lokalen Tumorbestrahlung auf die Stoffwechselintensität und -richtung von Cyclophosphamid auszuschließen ist.

Tabelle 5

Renale Ausscheidungsgrößen in % der Dosis an Cyclophosphamid und Metaboliten in Sammelfraktionen bis 120h nach i.v. Applikation von 30mg ^{3}H-Cyclophosphamid /kg KG bei der Ratte (n=5) ohne und mit lokaler Tumorvorbestrahlung mit unterschiedlichen Strahlendosen (M ± s)

Sammel-fraktion Stunden	Gesamtaus-scheidung % der Dosis	Ausscheidung an chromatographisch über Rf-Werte charakterisierten Substanzen in % der Dosis									
		0,9	0,8	0,7	0,6	0,55	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1 - 0
- CPM -											
0 - 24	62,25 ±3,45	2,9	5,0	14,0	4,4	1,7	23,5	1,4	2,0	3,4	3,9
24 - 48	2,20 ±0,79	0,2	0,2	0,4	0,2	-	0,6	0,3	0,1	0,1	0,1
48 - 72	0,65 ±0,28	0,1	0,1	0,1	-	-	0,2	0,1	-	0,1	-
72 - 96	0,48 ±0,17	-	0,1	0,1	-	-	0,1	-	-	0,2	-
96 -120	0,36 ±0,10	-	-	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	-	-
0 -120	65,99 ±3,21	3,2	5,4	14,7	4,6	1,8	24,5	1,8	2,2	3,8	4,0
150 rad+CPM											
0 - 24	62,82 ±8,22	1,1	6,9	14,5	4,3	2,1	21,3	1,6	2,4	4,0	4,5
24 - 48	1,98 ±0,76	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,4	0,3	-	0,2	0,1
48 - 72	0,76 ±0,33	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-	0,1	0,2	-
72 - 96	0,30 ±0,14	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-
96 -120	0,44 ±0,42	-	0,1	0,1	-	-	0,1	-	-	0,1	-
0 -120	65,90 ±7,10	1,5	7,5	15,1	4,5	2,2	21,9	1,9	2,5	4,6	4,6

Fortsetzung von Tabelle 5

		0,9	0,8	0,7	0,6	0,55	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1 - 0
300rad+CPM											
0 - 24	57,48 ± 16,65	2,5	6,9	12,9	4,6	1,9	17,9	1,7	2,1	3,4	3,6
24 - 48	1,72 ± 0,42	0,2	0,1	0,3	0,1	-	0,3	0,2	0,2	0,3	-
48 - 72	0,88 ± 0,30	-	0,1	0,2	0,1	-	0,2	-	-	0,3	-
72 - 96	0,50 ± 0,20	-	0,1	0,1	-	-	0,1	-	0,1	0,1	-
96 - 120	0,30 ± 0,14	-	-	0,1	-	-	0,1	-	0,1	-	-
0 - 120	60,86 ± 16,72	2,7	7,2	13,6	4,8	1,9	18,6	1,9	2,5	4,1	3,6
500rad+CPM											
0 - 24	71,50 ± 5,06	2,1	8,2	17,7	5,7	2,2	22,7	2,0	2,2	4,1	4,4
24 - 48	1,72 ± 0,42	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,4	-	0,2	0,3	-
48 - 72	0,88 ± 0,30	-	0,2	0,2	-	-	0,2	-	0,1	0,1	0,1
72 - 96	0,50 ± 0,20	-	-	0,1	-	-	0,1	-	0,1	-	0,1
96 - 120	0,30 ± 0,14	-	0,1	-	-	-	-	-	0,2	-	-
0 - 120	74,72 ± 4,66	2,2	8,7	18,3	5,8	2,3	23,4	2,0	2,8	4,5	4,6

3. Organkonzentrationen an ^{3}H-Cyclophosphamid und Metaboliten am 5. Tag nach i.v. Applikation mit und ohne lokale Vorbestrahlung.

Die in Tumor, Tumormuskel und Muskel der Ratte 120 h nach i.v. Applikation von 30 mg Cyclophosphamid/kg Körpergewicht ermittelten Organkonzentrationen sind als Mittelwerte (M $\pm$ S) in relativen Größen (%) in Tabelle 6 wiedergegeben. Daneben sind die Extraktionsgrößen in % und die Ergebnisse der chromatischen Analysen in diesen Extrakten in prozentualer Verteilung auf die Rf-Werte charakterisierten Substanzen aufgeführt.

Die ermittelten relativen Serumkonzentrationen lagen für alle Gruppen in gleichen Größenordnungen um 0,26 %. Die Konzentrationen in den analysierten Organen Tumor, Muskel und Tumormuskel sind gesichert höher als die Serumkonzentrationen ($p < 0,01$). Die Anreicherungsfaktoren lagen zwischen 8,08 (Tumor) und 16,53 (Muskel). In allen Gruppen ist auffällig, daß die relativen Konzentrationen im Muskel mindestens um den Faktor 1,5 höher waren, als im Tumormuskel und Tumor, der die niedrigsten Konzentrationen der 3 Organe aufwies. Bei allen 4 Versuchsgruppen entsprachen sich die Restkonzentrationen in den analysierten Organen weitgehend. Auf Grund der fehlenden statistischen Absicherung muß die Tendenz höherer Restkonzentrationen in Tumormuskel und Muskel der vorbestrahlten Gruppen als zufällig erachtet werden. Es läßt sich aber eine Tendenz dahingehend ablesen, daß die bestrahlten Tiergruppen im Tumor höhere Konzentrationen aufwiesen als die unbestrahlte Gruppe.
Eine spezielle Affinität von Cyclophosphamid bzw. reaktiven Metaboliten zum Tumor läßt sich aus diesen Ergebnissen für keine der Versuchsgruppen ableiten. Die während der Untersuchungen durch Tastbefund angenommene vermehrte Proliferationshemmung bzw. Teilremission in den vorbestrahlten Gruppen bestätigte sich nach Tötung der Tiere am 5. Tag in niedrigeren Tumorgewichten gegenüber der Monotherapie. Die Tumorgewichte

der unbehandelten Kontrollgruppe lagen 6 - 12fach höher als die der therapierten Gruppen, wobei deutlich höhere Signifikanz der Unterschiede für die lokal vorbestrahlten Gruppen ($p < 0,01$) im Vergleich zur reinen Cyclophosphamid-Gruppe ($p < 0,025$) zu finden war. (Tumorgewichte der vorbehandelten Gruppen 1,15 - 1,34 g, der reinen Cyclophosphamid-Gruppe 2,61 g, der unbehandelten Gruppe 19,74 g). Bei der Obduktion der Tiere zeigte sich, daß die Tumoren der vorbestrahlten Tiergruppen im Vergleich zur ausschließlich Cyclophosphamid-therapierten Gruppe deutlich kleiner (kirschkerngroß) und abgekapselter waren, während die Tumoren der nur mit Cyclophosphamid-therapierten Gruppe auf ein vermehrtes infiltrierendes Wachstum schließen ließen, was mit den unterschiedlichen Restkonzentrationen in den Tumoren der Versuchsgruppen in Zusammenhang gesehen werden könnte.
Die Anteile an extrahierbarer ^{3}H-Aktivität wiesen in den einzelnen Gruppen gleiche Werte für die entsprechenden Organe auf. Sie lagen beim Tumor in allen Gruppen zwischen 45 % und 50 % und fielen über den Tumormuskel zum Muskel hin auf ca. 15 % ab.
Diese Größen der Extrahierbarkeit lassen darauf schließen, daß in Tumormuskel und vor allem im Muskel vermehrt Reaktionen von primären und sekundären Metaboliten des Cyclophosphamid mit Biomolekülen stattgefunden haben, die beim Tumor deutlich niedriger lagen.

In den Ergebnissen der chromatographischen Analysen der Organextrakte fanden sich in Muskel und Tumormuskel die höchsten Konzentrationsanteile für die Substanzgruppe Rf 0 - 0,1, die vorwiegend Reaktionsprodukte von reaktiven Metaboliten des Cyclophosphamid mit niedrigmolekularen Biomolekülen repräsentiert. Beim Tumor zeigten sich dagegen die höchsten Konzentrationsanteile für den stabilen Metabolit Rf 0,3 mit alkylierender Potenz. Cyclophosphamid (Rf 0,7), sowie die Metabolite Rf 0,2 und Rf 0,55 konnten in keinen der analysierten Extrakte mehr nachgewiesen werden. Carboxyphosphamid

(Rf 0,5) fand sich in geringen prozentualen Anteilen nur noch in den Extrakten von Tumormuskel und Muskel der reinen Cyclophosphamid-Gruppe und der lokal mit 500 rad vorbestrahlten Gruppe, 4-Keto-Cyclophosphamid (Rf 0,6) nur noch mit geringen Anteilen in den Tumorextrakten der vorbestrahlten Gruppen. Auch die beiden stark lipophilen Abbauprodukte Rf 0,8 und Rf 0,9 traten in allen Extrakten der analysierten Organe mit auffällig hohen Konzentrationsanteilen auf.

Tabelle 6

Relative Konzentrationen (%) in Tumor, Tumormuskel und Muskel, Extraktionsgrößen der Organe (%) und prozentuale Anteile an über Rf-Werte charakterisierten Substanzen in den Extrakten bei der Ratte (n=5) am 5. Tag nach i.v. Applikation von 30 mg ^{3}H-Cyclophosphamid (CPM)/kg KG ohne und mit lokaler Vorbestrahlung des Tumors mit unterschiedlichen Strahlendosen (M ± s).
(100 % rel.Konz. = 30 µg bzw. 0,1 µmol CPM äquimolare Metabolite/ml bzw. g Organ

Organ Therapie	rel. Konz. %	Extraktion %	prozentuale Anteile an über Rf-Werte charakterisierten Substanzen in Extrakten									
			0,9	0,8	0,7	0,6	0,55	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1 - 0
TUMOR												
CPM	1,71 ± 0,50	50,10 ± 5,94	-	21,3	-	-	-	-	28,5	50,2	-	-
150rad+CPM	1,88 ± 0,74	49,03 ± 2,38	7,9	10,6	-	6,8	-	-	-	66,0	-	8,7
300rad+CPM	2,50 ± 0,50	44,23 ± 7,72	3,7	7,9	-	4,2	-	-	-	75,7	-	8,6
500rad+CPM	2,32 ± 0,76	44,50 ± 2,58	4,9	11,3	-	11,0	-	-	8,3	51,2	-	13,2
TUMORMUSKEL												
CPM	2,94 ± 0,63	55,49 ± 12,28	5,4	59,6	-	-	-	5,3	-	11,9	-	17,9
150rad+CPM	2,99 ± 0,88	31,14 ± 4,14	5,5	29,4	-	-	-	-	2,8	-	-	62,3
300rad+CPM	2,55 ± 0,44	39,93 ± 12,70	0,6	43,2	-	-	-	1,1	-	16,2	-	39,0
500rad+CPM	2,64 ± 0,65	29,28 ± 3,78	3,8	22,5	-	-	-	18,7	-	-	-	54,9
MUSKEL												
CPM	7,13 ± 3,77	10,38 ± 4,64	2,0	30,8	-	-	-	32,0	-	-	-	35,3
150rad+CPM	4,29 ± 1,15	20,48 ± 8,34	5,1	39,8	-	-	-	-	6,4	-	-	48,7
300rad+CPM	4,37 ± 0,92	16,77 ± 2,51	2,7	24,6	-	-	-	-	-	-	-	72,7
500rad+CPM	4,38 ± 1,06	14,49 ± 1,09	5,9	20,6	-	6,0	-	4,2	3,6	-	-	59,6

4. Spezifische DNS- und RNS-Gehalte, spezifische Alkylierung der DNS und ^{14}C-Desoxy-Thymidin-Index im Tumor am 5. Tag nach ^{3}H-Cyclophosphamid-Therapie ohne und mit lokaler Vorbestrahlung

In Tabelle 7 sind die spezifischen Gehalte an DNS und RNS (mg/g Tumor), die relativen Konzentrationen (%) an Cyclophosphamid und äquimolaren Metaboliten, die mit DNS, RNS und Rückstand (Proteine, subzelluläre Organellen, Membranen) reagierten, die spezifische Alkylierung (nmol CPM/mg Nukleinsäure) und die hieraus berechnete Anzahl von Nukleotiden pro Alkylierung in den gepoolten Tumoren der Versuchsgruppen am 5. Tag nach intravenöser Applikation von 30 mg ^{3}H-Cyclophosphamid/kg Körpergewicht ohne und mit lokaler Vorbestrahlung der Tumoren mit verschiedenen Dosen wiedergegeben. Da diese Analysen im gepoolten Tumormaterial der verschiedenen Versuchsgruppen durchgeführt wurden, war eine statistische Auswertung der Ergebnisse nicht möglich. Die Ergebnisse der RNS-Analysen müssen mit Vorbehalt gewertet werden, da die Möglichkeit der Mitextraktion geringer Lipid-, Protein- und Aminosäurekonzentrationen nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Die Ergebnisse der RNS-Analysen im Tumor der verschiedenen Versuchsgruppen erlauben jedoch auf Grund gleicher Methodik eine vergleichende Betrachtung.

Bei niedrigen relativen Konzentrationen für Metabolitenreaktionen mit der DNS/g Gewebe (%) und entsprechend dem hohen DNS-Gehalt zeigte sich in der reinen Cyclophosphamid-Gruppe eine deutlich niedrigere spezifische Alkylierung (0,11 nmol/mg DNS) und eine entsprechend höhere Nukleotidzahl pro Alkylierung (30, 27×10^{3}) als in den Vorbestrahlungsgruppen. Alle lokal vorbestrahlten Gruppen zeigten eine mindestens 4fach höhere spezifische Alkylierung der DNS und entsprechend niedrigere Nukleotidzahlen pro Alkylierung auf. Innerhalb der mit verschiedenen Dosen vorbestrahlten Gruppen wies die 500 rad-Gruppe bei dem niedrigsten DNS-Gehalt (1,03 mg/g Gewebe) und der höchsten relativen Konzentration

(%) in der DNS (0,86 %), die höchste spezifische Alkylierung der DNS (0,93 nmol/mg), bzw. niedrigste Anzahl der Nukleotide/Alkylierung ($3,5 \times 10^3$) auf, während sich die 150 rad- und 300 rad-Gruppen in den Analysenergebnissen nur geringfügig unterschieden. Die Nukleotidzahlen/Alkylierung und die spezifische Alkylierung der DNS aller Behandlungsgruppen entsprachen sich weitgehend, obwohl sie teils recht unterschiedlich hohe Gehalte und relative Konzentrationen aufwiesen.
Wie aus den relativen Konzentrationen (%) deutlich wird, entfielen die höchsten über die ^{3}H-Aktivität berechneten Alkylierungsraten in allen Versuchsgruppen auf die Nukleinsäuren, vorwiegend auf die RNS. Während, mit Ausnahme der 150 rad-Gruppe, die relativen Konzentrationen in DNS und Rückstand etwa gleich hoch lagen, war das Verhältnis der DNS zur RNS in den relativen Konzentrationen bei der Cyclophosphamid-Gruppe und der 300 rad-Gruppe etwa 1:2. Bei der 150 rad-Gruppe und der 500 rad-Gruppe lag dieses Verhältnis deutlich verändert bei 1:1 vor.

Die Desoxy-Thymidin-Indices für Tumor, Tumormuskel und Muskel (100 % = Mittelwerte der unbehandelten Kontrollgruppe) sind in Tabelle 8 wiedergegeben. Die Mittelwerte der Desoxy-Thymidin-Indices für die Tumoren aller Versuchsgruppen lagen mehr oder weniger deutlich über 100 %, d.h., daß in den Tumoren der behandelten Gruppen eine gesteigerte DNS-Synthese abzulaufen scheint. Auf Grund der erheblichen Standardabweichungen der Mittelwerte waren jedoch die Unterschiede der Indices in Tumor und Skelettmuskel innerhalb der Versuchsgruppen, wie auch gegenüber der Kontrollgruppe biologisch nicht signifikant. Die ermittelten Werte lagen alle im gleichen Bereich. Die Unterschiede müssen auf Grund fehlender statistischer Absicherung als zufällig angesehen werden.
Im Tumormuskel dagegen sind deutliche Effekte auf den Thymidin-Einbau ersichtlich und zwar zeigte die 500 rad-Gruppe, gefolgt von der 150 rad-Gruppe, den niedrigsten Wert. Die Unterschiede beider Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe

sind statistisch gesichert ($p < 0{,}01$ 500 rad-Gruppe, $p < 0{,}05$ 150 rad-Gruppe). Die Cyclophosphamid-Gruppe und die 300 rad-Gruppe wiesen zwar niedrigere Indices als die Kontrolle auf, doch ist auf Grund der großen Streuung keine Sicherung gegenüber der Kontrolle gegeben.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen mit dem erforderlichen Vorbehalt auf Grund möglicher Analysenfehler den Schluß zu, daß am 5. Tag nach Cyclophosphamid-Therapie ohne und mit lokaler Vorbestrahlung des experimentellen Tumors mit unterschiedlichen Strahlendosen eine Korrelation zwischen dem spezifischen Gehalt an Nukleinsäuren, sowie der spezifischen Alkylierung von DNS und RNS im Tumorgewebe, den DNS-Syntheseraten und den Tumorgewichten besteht. Es kann angenommen werden, daß sich unter unseren extremen Versuchsbedingungen die Tumoren aller Versuchsgruppen am 5. Tag nach Therapie bereits in der beginnenden Phase einer überschießenden DNS-Synthese und erneuten Wachstums befinden. Die analytisch nachgewiesenen erhöhten Reaktionen von aktiven Metaboliten des Cyclophosphamid unter den Bedingungen einer lokalen Vorbestrahlung lassen mit erforderlichem Vorbehalt auf eine Begünstigung des zytostatischen Effektes schließen.

Tabelle 7

Spezifische Gehalte an Nukleinsäuren (mg/g), relative Konzentrationen an äquimolaren ^{3}H-Cyclophosphamid-Metaboliten in DNS, RNS und Rückstand (%), spezifische Alkylierungen der Nukleinsäuren(nmol/mg) und Anzahl der Nukleotide pro Alkylierung im Tumor von Ratten (n=5) am 5. Tag nach i.v. Applikation von 30 mg ^{3}H-Cyclophosphamid (CPM)/kg KG ohne und mit lokaler Vorbestrahlung des Tumors mit unterschiedlichen Strahlendosen

Therapie	mg / g Tumor		rel. Konz. (%)			spez. Alkylierung nmol/mg		Nukleotide x 10^{3}/ Alkylierung	
	DNS	RNS	DNS	RNS	Rückstand	DNS	RNS	DNS	RNS
CPM	3,12	6,24	0,32	0,53	0,29	0,11	0,05	30,27	66,6
150rad + CPM	1,25	5,43	0,62	0,44	0,30	0,55	0,09	6,05	37,0
300rad + CPM	1,40	6,00	0,39	0,59	0,38	0,31	0,10	10,74	30,27
500rad + CPM	1,03	4,81	0,86	0,61	0,67	0,93	0,15	3,5	21,81

Tabelle 8

Desoxy-Thymidin-Index (%) in Tumor, Tumormuskel und Muskel der Ratte (n=5) am 5. Tag nach i.v. Applikation von 30 mg ^{3}H-Cyclophosphamid (CPM)/kg KG ohne und mit Vorbestrahlung des Tumors mit unterschiedlichen Strahlendosen (M ± s)

Therapie	Desoxy-Thymidin-Index (%)		
	Tumor	Tumormuskel	Muskel
unbehandelte Kontrolle	100,0 ±17,0	100,0 ±30,0	100,0 ±37,0
- CPM -	159,0 ±37,0	50,0 ±38,0	122,0 ±36,0
150rad + CPM	228,0 ±73,0	32,0 ±17,0	71,0 ±23,0
300rad + CPM	176,0 ±87,0	39,0 ±44,0	73,0 ±34,0
500rad + CPM	173,0 ±90,0	18,0 ± 9,0	91,0 ±35,0

5. Überlebensraten von Ratten mit und ohne lokale Vorbestrahlung des Tumors unter Cyclophosphamid-Therapie

Aus Tabelle 9 sind die Überlebensraten der verschiedenen Behandlungsgruppen und der unbehandelten Kontrollgruppe (n = 10) in prozentualen Anteilen ersichtlich.

Bereits am 13. Tag nach Therapie, d.h. am 17. Tag nach Implantation des Tumors, starben die ersten Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe, am 18. Tag lebten nur noch 50 %, am 25. Tag war das letzte Tier dieser Gruppe verendet. Die Absterberaten verteilten sich kontinuierlich auf ein Zeitintervall von insgesamt 12 Tagen.
In der Versuchsgruppe, die nur mit Cyclophosphamid behandelt wurde, starb wie in der Kontrollgruppe bereits am 13. Tag das erste Tier, es lebten aber noch nach 25 Tagen 50 % der Tiere, am 29. Tag 30 %. 20 % der Tiere dieser Gruppe wurden am 64. Tag getötet.
Bei der Betrachtung der einzelnen, mit lokaler Vorbestrahlung und Cyclophosphamid therapierten Gruppen zeigte sich kein einheitliches Bild. Die mit 150 rad vorbestrahlte Gruppe wies bereits am 11. Tag nach Therapie, noch bevor ein Tier der unbehandelten Kontrollgruppe verendet war, 10 % Absterberate auf, wobei das verendete Tier bereits bei Therapiebeginn einen auffallend großen Tumor gezeigt hatte. Am 15. Tag, an dem noch 60 % der Kontrollgruppe lebten, waren es in dieser Gruppe noch 70 %. Innerhalb weniger Tage starben dann in rascher Reihenfolge noch weitere Tiere, so daß am 22. Tag nur noch 40 % der Tiere lebten. Im weiteren zeitlichen Verlauf verlangsamte sich die Zahl der Todesfälle: am 36. Tag waren noch 30 %, am 42. Tag 20 % am Leben, am 48. Tag starb das letzte Tier.

Vergleichbar verhielten sich die mit 500 rad und 50 rad vorbestrahlten Tiergruppen: Der Beginn des Absterbens stellte sich später als bei allen anderen Gruppen ein.

Alle Tiere lebten noch bei der 500 rad Gruppe am 18. Tag, bei der 50 rad Gruppe am 21. Tag. In langsamer kontinuierlicher Folge sanken die Überlebensraten in der 500 rad Gruppe bis zum 29. Tag nach Therapie auf 50 %, bis zum 48. Tag auf 0 %. Die mit 50 rad vorbestrahlte Gruppe, die das größte Intervall zwischen Therapie und 1. Todesfall zeigte, hatte auch den längsten 50 % Überlebensindex mit 31 Tagen, doch sank dieser dann schnell innerhalb von 10 Tagen auf Null, zu einem Zeitpunkt, zu dem in allen anderen Behandlungsgruppen noch 20 % der Tiere lebten.
Bei der Obduktion der verendeten Tiere ergab sich, daß alle Tumoren nach außen durchgebrochen waren. Die Metastasierung hatte ohne Ausnahme stattgefunden; bis zum 15. Tag waren die Metastasen der behandelten Gruppen klein, später nahmen sie teilweise Größen bis zu 1 Gramm an. Eine Metastasierung erfolgte vorwiegend an der Lunge, Wirbelsäule und in der Leistengegend bei den behandelten Gruppen, vereinzelt konnten auch an Milz und Duodenum bei der 500 rad vorbestrahlten Gruppe Metastasen gefunden werden.
Bei der Kontrollgruppe fanden sich noch zusätzlich Metastasen am Dickdarm und an der Leber, die oft dunkel verfärbt bis nekrotisch erschien.

Bei der Beurteilung der Tumoren zwischen Behandlungsbeginn und Obduktion der Tiere zeigte sich Wachstumsstillstand und teilweise Rückbildung des Tumorgewebes in den ersten Tagen, ab 6. - 10. Tag setzte erneutes Tumorwachstum ein, wobei nur in der mit 150 rad bestrahlten Gruppe bei den über längeren Zeitraum überlebenden Tieren bis zum 15. Tag auffällig kleine Tumoren tastbar waren; auch am 20. Tag waren sie noch kleiner als in den anderen Gruppen.

Die beiden Tiere der reinen Cyclophosphamid-Gruppe, die den 64. Tag überlebten und dann getötet wurden, konnten insofern als geheilt gelten, als bei der Obduktion an der

Impfstelle nur noch eine Narbe, makroskopisch keine Tumormasse und auch keine Metastasen im Organismus gefunden wurden. Die Tumoren dieser beiden Tiere waren allerdings bei Behandlungsbeginn bereits als sehr klein eingestuft worden. Trotz Implantation gleicher Volumina einer Mischung aus Aszites-Suspension mehrerer Spendertiere waren die Tumorgrößen bei Therapiebeginn stark unterschiedlich, was selbstverständlich den Therapieeffekt und damit die Überlebensraten entsprechend beeinflußte. Eliminiert man aus unserer vergleichenden Betrachtung die bei reiner Cyclophosphamid-Therapie geheilten beiden Tiere, die zu Therapiebeginn die kleinsten Tumoren aufzeigten, so ergibt sich ein deutlicher gesteigerter Effekt der kombinierten Strahlen-Chemotherapie, wie er zu den Zeitpunkten 50 % und 100 % Absterbegrößen zum Ausdruck kommt. Aus besagten Gründen verwischt sich leider der Effekt der Dosis in der Vorbestrahlung.

Tabelle 9

Überlebensraten (%) von Tumorratten (n=10) nach i.v. Stoßtherapie mit 30 mg Cyclophosphamid (CPM) / kg KG mit und ohne lokale Vorbestrahlung des Tumors mit verschiedenen Dosen 85 kV Rö-Strahlung

Therapie	10	20	25	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48 . . . 64 Tage
50rad + CPM	100	100	70	60	50	30	30	20	10	0	-	-	- -
150rad + CPM	100	60	40	40	40	40	30	30	30	20	20	20	0 -
500rad + CPM	100	90	70	50	50	40	30	20	20	10	10	10	0 -
- CPM -	100	80	50	30	30	30	30	20	20	20	20	20	20 20
unbehandelte Kontrolle	100	30	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- -

IV. DISKUSSION

Die Ergebnisse dieser tierexperimentellen Studie können nur einen durch die Versuchsanstellung begrenzten Einblick in die pharmakodynamische Wirkung des alkylierenden Zytostatikums Cyclophosphamid auf einen mit unterschiedlichen Dosen lokal vorbestrahlten, soliden Tumor der Ratte geben. Die aufwendigen radiochemischen und biochemischen Analysenverfahren erlaubten nur den Einsatz relativ kleiner Tierzahlen in den jeweiligen Versuchsgruppen, wodurch Unterschiede in den Analysenergebnissen dieser Gruppen nicht immer statistisch abgesichert, sondern nur als Tendenzen gewertet werden konnten. Wenn wir auf Grund unserer Ergebnisse einer Kombination von radiologischer Vorbehandlung und Therapie mit einem alkylierenden Zytostatikum der Oxazaphosphorin-Reihe einen additiven, d.h. gesteigerten Therapieeffekt zuschreiben, so muß dies aus u.a. Gründen mit dem entsprechenden kritischen Vorbehalt gewertet werden und kann nur Gültigkeit besitzen für die in dieser orientierenden Studie von uns vorgegebenen Versuchsparameter.

Ionisierende Strahlung setzt ihre primären und sekundären Effekte, wie auch Cyclophosphamid, vorwiegend im S- und G_2-Phasenbereich des Zellzyklus (1, 23, 29, 31, 28, 45). Eine Kombinationstherapie in Form von lokaler Vorbestrahlung des Tumors und anschließendem Zytostatikastoß soll letztlich dazu führen, die toxischen Nebenwirkungen der Chemotherapie auf den Organismus durch Dosisreduzierung bei gleichem zytostatischen Effekt einzuschränken.

Das Timing, d.h. zeitlicher Abstand zwischen Strahlen- und Chemotherapie, kann für den therapeutischen Erfolg von ausschlaggebender Bedeutung sein. Führt der Strahleneffekt zu einer zeitlich limitierten Arretierung von Zellen in der G_2-M-Phase, so kann Cyclophosphamid diese kumulierten Zellen entsprechend schädigen. Erfolgt die Chemotherapie

nach Aufhebung des Blocks, so würde dieser Effekt reduziert, es sei denn, die Therapie würde eingesetzt, wenn sich die teilsynchronisierte Zellpopulation des Tumors in der S-Phase befindet. Wirkt sich der strahleninduzierte G_2-Block in einem gesteigerten Recruitment aus, d.h. vermehrten Eintritt von Zellen aus der G_0 - G_1-Phase in die S-Phase, könnte sich der Chemotherapieeffekt auf Grund der phasenspezifischen Wirkung zusätzlich erhöhen.
Die nach der Strahlennoxe einsetzenden Repairvorgänge könnten sich ebenfalls insofern günstig auswirken, daß unter der Voraussetzung der Möglichkeit einer Aktivierung von Cyclophosphamid auch in der Tumorzelle durch gesteigerte spezifische Enzymaktivitäten, die Bildung spezifisch wirksamer Aktivierungsprodukte lokal begünstigt wird.

In dem Vorversuch versuchten wir zu klären, ob und in welchem Umfang durch eine lokale Bestrahlung des soliden Tumors am 5. Tag nach Implantation eine Hemmung der Permeabilität und der Utilisation von Vorläufern der Protein- und DNS-Synthese auftritt und ob diese Synthesehemmungen im Zeitraum 6 - 15 Stunden nach Bestrahlung mit 150 rad wertbare Änderungen aufzeigen. Abgesehen von der im Vergleich zum Menschen geringeren Strahlensensibilität der Ratte und der experimentellen Tumoren (14,15) ist der von uns eingesetzte Rattentumor auf Grund seiner Chemoresistenz auch vermehrt strahlenresistent. Die von uns im Vorversuch applizierte Strahlendosis von 150 rad kann daher nicht als therapeutisch effektiv angesehen werden, d.h. letale Schädigungen von Tumorzellen müssen als zufällig gewertet werden. Wir fanden im Zeitraum 6 - 15 Stunden nach Bestrahlung im Tumor eine gehemmte Proteinsynthese, d.h. signifikant erniedrigte L-Leucin-Einbauraten gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Die gleichfalls erniedrigten Desoxy-Thymidin-Indices waren jedoch zufällig, bzw. statistisch nur schwach abgesichert (vergleiche Abb. 3). Wir können daher nur von der Tendenz einer DNS-Synthesehemmung sprechen. Da die S-Phasendauer des

Tumors etwa der halben Zykluszeit (normale Zykluszeit ca. 22 Stunden) entspricht (22), kann für den von uns analysierten Zeitraum auf Grund der fehlenden signifikanten Unterschiede der Utilisationsgrößen zu den analysierten Zeitpunkten ein Eintritt partiell synchronisierter Zellen in die S-Phase ausgeschlossen werden. Ob die Depression der Syntheseraten auf die signifikant erniedrigten Inkorporationsraten und damit auf eine strahleninduzierte Einschränkung der Permeation zurückzuführen ist, kann nicht ausgeschlossen werden. Es besteht jedoch die Wahrscheinlichkeit, daß Permeation und Utilisation auf geringe Fraktionen der Zellpopulation in der S-Phase zurückzuführen sind, d.h. daß der Block in der G_2-Phase in unserem Untersuchungszeitraum noch weitgehend anhält. Allerdings muß die Möglichkeit funktioneller und struktureller Schädigungen in Betracht gezogen werden (16). Für ein optimales Timing ergab sich aus diesen Ergebnissen kein sicherer Anhaltspunkt. Da nach Cyclophosphamid-Stoßtherapie die Verteilung im Organismus der Ratte 30 Minuten nach Injektion abgeschlossen ist, und Maximalkonzentrationen sowohl an 4-Hydroxy-Cyclophosphamid als auch aktiven Folgeprodukten zwischen 30 Minuten bis 1 Stunde p.i. liegen, bei noch wertbaren zytostatischen/zytotoxischen Effekten bis zu 4 Stunden (6,41), wählten wir 8 Stunden p.r. für den Zeitpunkt der Cyclophosphamid-Stoßtherapie. Unter der Annahme des zu diesem Zeitpunkt noch bestehenden Blocks in G_2, wäre die bei Bestrahlung in der S-Phase befindliche Zellpopulation mit in der G_2-Phase arretiert worden und mit den im Zeitraum 8 - 12 Stunden in der S-Phase befindlichen, bzw. in die S-Phase eintretenden Tumorzellen durch das Zytostatikum geschädigt worden.

Das in unseren Versuchen eingesetzte Solide-Yoshida-Sarkom der Ratte zeigt gegenüber den Oxazaphosphorinderivaten eine Teilresistenz. Um eine Überlebensrate von mehr als 50 % der Tiere über 90 Tage zu erreichen, ist mit einer Dosis von 80 mg Cyclophosphamid/kg Körpergewicht eine 10-fach höhere

Dosis erforderlich als bei der sensiblen Form des Tumors (27). Im Gegensatz zu unseren Versuchsbedingungen erfolgte dabei die Therapie in vier täglichen Fraktionen, beginnend am Tag der Implantation. Auch wenn die Vorbestrahlung einen gewissen therapeutischen Effekt erzielt, muß von uns die in der Stoßtherapie applizierte Dosis von 30 mg Cyclophosphamid/kg Körpergewicht als unterschwellig bezeichnet werden.

Als weiteres Extrem gilt für unsere Versuchsanstellung, daß der Beginn der Therapie erst am 5. Tag nach Implantation der Ascites-Suspension bei tastbaren Tumoren von Erbsen- bis Kirschkerngröße angesetzt wurde. Dieses Stadium ist durch eine ungehemmte Proliferation des Tumors mit Metastasierung gekennzeichnet. Bis zum 5. Tag nach Applikation der unterschwelligen Cyclophosphamid-Dosis (d.h. am 10. Tag nach Implantation) zeichnet sich eine deutliche Teilremission ab mit anschließendem Übergang in eine erneute ungehemmte Wachstumsphase. Da wir für die radiochemische und biochemische Analytik auf entsprechende Mengen an Tumormaterial angewiesen waren, und um therapeutische Effekte zu erfassen, wählten wir diese, als extrem zu bezeichnenden Versuchsbedingungen. Entsprechendes gilt für die Überlebensversuche, bei denen jedoch die unvermeidbar unterschiedlichen Wachstumsstadien der Tumoren bei der erforderlichen Vielzahl von Versuchstieren als zusätzliches Kriterium die Auswertungen der Untersuchungen belastete.

Die Ergebnisse des Therapieversuchs ließen bei Tötung der Tiere am 5. Tag nach Cyclophosphamid-Applikation einen gesteigerten zytostatischen Effekt der Kombinationstherapie erkennen. Die mittleren Tumorgewichte der vorbestrahlten Gruppen lagen um den Faktor 2 niedriger als bei der nicht vorbestrahlten Versuchsgruppe. Die Obduktionsbefunde bestätigten, daß bei allen Tieren der vorbestrahlten Versuchsgruppen die Tumoren eingekapselt und deutlich kleiner waren als bei denen der Cyclophosphamid-Gruppe, bei der die größeren Tumoren in das Muskelgewebe infiltrierten. Die Ergebnisse der Überlebensversuche stehen anscheinend teilweise in

einem Widerspruch zu diesen Befunden. In den Versuchsprotokollen sind in den einzelnen Behandlungsgruppen die Tumoren bei Therapiebeginn in unterschiedlichen Wachstumsstadien festgehalten. In der reinen Cyclophosphamid-Therapiegruppe befanden sich bei 2 Tieren die kleinsten Tumoren im Kollektiv der 60 Versuchstiere. Die Tumoren dieser beiden Tiere zeigten Vollremission. Korrigiert man diesen Befund durch Ausschluß dieser beiden Tiere in den Berechnungen der prozentualen Überlebensraten für die Tiere der Cyclophosphamid-Gruppe, auf der 100-%-Basis für die restlichen 8 Tiere, so ergeben sich im Vergleich der Therapiegruppen auch hier für die Kombinationstherapie deutlich positive Effekte. Sowohl die Zeitpunkte für 50 %, wie auch für 100 % der Todesfälle liegen deutlich später als unter der Monotherapie mit Cyclophosphamid (vergleiche Abb.4).

Die Ergebnisse der speziellen Analysen im Tumorgewebe der Tiere aller 4 Versuchsgruppen am 5. Tag nach Injektion des Zytostatikums lassen eine enge Korrelation zu den erwähnten therapeutischen Effekten erkennen. Bei auffällig hohen Extraktionsgrößen, d.h. Anteilen an freien Metaboliten an den Gesamtkonzentrationen in den Tumoren aller Versuchsgruppen, läßt sich eine auffällige Tendenz höherer spezifischer Restkonzentrationen, die auf Reaktionen von aktivierten Metaboliten des Cyclophosphamid mit Biomolekülen zurückgeführt werden müssen, in den Bestrahlungsgruppen erkennen, bei höchsten Werten in der mit 500 rad bestrahlten Gruppe. Entsprechend fanden sich in den vorbestrahlten Gruppen vermehrte Reaktionen mit beiden Nukleinsäuren und der nicht extrahierbaren Rückstandsfraktion pro Gramm Tumor, niedrigere spezifische Gehalte an Nukleinsäuren vorwiegend an der DNS und höhere spezifische Alkylierungsraten von DNS und RNS gegenüber der nur mit Cyclophosphamid therapierten Versuchsgruppe, wie sie in Abb. 5 graphisch dargestellt sind, wobei auch hier die mit 500 rad vorbestrahlte Gruppe die extremsten Werte aufzeigte. Diese von uns auf Alkylierungen zurückgeführten

Reaktionen können auch möglicherweise auf Reaktionen anderer Art beruhen, wie z.B. Fixierungen von 4-Hydroxy-Cyclophosphamid/Aldophosphamid an Sulfhydryl-Gruppen von Biomolekülen (R-S-4-Mercapto-Cyclophosphamid) (41). Die erschöpfende Vorextraktion des gepotterten Tumormaterials, die alkalische und die saure Hydrolyse zur Extraktion der Nukleotide von Nukleinsäuren sprechen allerdings mehr für Alkylierungen. Als Alkylanz kommt hier nicht nur NH-Lost-Phosphorsäurediamid in Betracht, sondern auch die primären Aktivierungsprodukte und reaktivierte stabile Metabolite mit alkylierender Aktivität. (42). Untersuchungen von Schaumlöffel an isolierter Protein-, Chromatin- und RNS-freier DNS (40) und Harbers (17) bestätigen bei Anwendung verschiedener Analysenverfahren die hohen spezifischen Alkylierungsraten der Nukleinsäuren nach Cyclophosphamid-Therapie, wie sie auch in unseren Ergebnissen festgestellt wurden. Die Desoxy-Thymidin-Indices der Tumoren aller Versuchsgruppen lagen höher als in der Kontrollgruppe mit der Tendenz gesteigerter DNS-Synthese in den Bestrahlungsgruppen, wobei die Unterschiede auf Grund fehlender statistischer Absicherung als zufällig angesehen werden müssen. Eine überschießende Reaktion der DNS-Synthese muß nicht mit einer ebenfalls vermehrten Proliferation in Zusammenhang stehen. Aus Untersuchungen von Schaumlöffel (41) und unseren eigenen Tastbefunden in den Überlebensversuchen geht hervor, daß ab dem 5. Tag nach Chemotherapie sich die Tumoren in einer Übergangsphase hin zu erneutem Wachstum befinden. Wird die Teilremissionsphase durch Nekrotisierung der durch die Therapie letal geschädigten Zellen repräsentiert, so wird dieser Prozeß, der für diesen Tumor einer biologischen Halbwertszeit von mehr als 4 Tagen unterliegt (41), in Abhängigkeit von der Höhe der Cyclophosphamid-Dosis durch das Eintreten nicht geschädigter, oder nach geringfügiger Schädigung regenerierter Zellen in den Zyklus überlagert. Die normalisierte DNS-Syntheserate am 5. Tag nach Therapie könnte diesem Prozeß zugeordnet werden. Die noch am 5. Tag nach Cyclophosphamid-Therapie analysierten hohen spezifischen Alky-

lierungen der DNS im Tumor können nur einen Durchschnittswert für die Gesamtzellpopulation darstellen. D.h. in dieser Population mischen sich Zellen mit überhöhten, letal wirksamen Alkylierungen und solche mit geringsten Reaktionen bei Vorliegen aller Übergänge. Die regenerationsfähige Zellpopulation ist letztlich für die Rezidivierung des Tumors verantwortlich. Eine Zuordnung über die ^{3}H-Aktivität des tritiierten Zytostatikums zu einzelnen Nukleotiden und damit auch ein Nachweis, daß es sich um Reaktionen entsprechender Metabolite mit Nukleotiden und nicht um durch Hydrolyse freigesetzte deaktivierte Substanzen handelt, war bedingt durch die niedrigen spezifischen Aktivitäten der Nukleinsäureextrakte nicht möglich. Diese Alkylierungen von Nukleinsäuren und speziellen Zellorganellen müssen in spezifische und unspezifische Reaktionen differenziert werden, da wirksame Effekte nur durch erstere zu erwarten sind. Die Frage, welche Reaktionen mit welchen subzellulären Bestandteilen spezifisch im Hinblick auf den zytostatischen Effekt wirkt, kann noch nicht beantwortet werden.

Die Frage nach dem Wirkmechanismus einer kombinierten Strahlen-Chemotherapie maligner Tumoren kann nur mit größtem Vorbehalt beantwortet werden. Linden, Prévôt und Mitarbeiter (25,26,34) konnten bei in-vitro-Versuchen mit fraktionierten Röntgendosen (Gesamtdosis 225 rad Röntgenstrahlung) einen Mitoseblock in den Zellkulturen nachweisen. Diese Versuche an Mäusefibrozyten und L-Zellen ergaben, daß mit einer fraktionierten Bestrahlung eine weitgehende Synchronisation von Zellkulturen zu erzielen ist, was die Autoren mit einem strahleninduzierten G_2-Block erklären. Hier muß nach unserer Auffassung allerdings berücksichtigt werden, daß sich die Wirkung einer Strahlendosis im wässrigen Kulturmedium durch die Bildung und Reaktion von Wasserradikalen potenziert und, daß in-vitro-Untersuchungen nur mit Vorbehalt auf die Verhältnisse in vivo übertragen werden können. Nach Trott (52) und Cormack (11) kann es unter entsprechenden Bestrahlungsbedingungen zu einer Zyklusverlängerung kommen. Die Inkorporations-

und Utilisationsgrößen des bestrahlten Tumors in unserem Vorversuch, wie auch die gesteigerten Alkylierungsraten bei Cyclophosphamid-Therapie bei Vorbestrahlung könnten durch einen G_2-Block und einem hierdurch verminderten Übergang von G_1 nach S in Zusammenhang mit einer Zyklusverlängerung erklärt werden.

Nach Puck (35) und Hagen (16) spielen Membranschädigungen durch Bestrahlung dosisabhängig eine Rolle. Solche Membranschädigungen können den aktiven Transport polarer Precursoren und Ionen negativ beeinflussen. Die passive Permeabilität lipophiler Substanzen und damit auch des Cyclophosphamid dürften in Abhängigkeit vom Konzentrationsgefälle in ihrer Permeabilität durch Membranschädigungen eher noch begünstigt werden. Die Permeabilität der polaren primären und sekundären Abbauprodukte des Zytostatikums mit alkylierender Aktivität ist vernachlässigbar (13), kann zwar zu zytotoxischen, nicht aber zu zytostatischen Effekten führen (42). Eine Begünstigung der Permeabilität dieser polaren Substanzen durch die relativ niedrigen Vorbestrahlungsdosen kann nach unserer Auffassung nicht ausgeschlossen werden (vergl. 35). Die vermehrten Reaktionen von aktivem Cyclophosphamid mit biologischen Substraten in Tumorzellen müssen entweder auf das Vorliegen vermehrter Populationsanteile in sensiblen Phasen, auf die vermehrte Permeation von Cyclophosphamid in die Tumorzelle mit folgender Aktivierung oder auf gesteigerte Permeabilität für das in der Leber gebildete 4-Hydroxy-Cyclophosphamid zurückgeführt, und als Folge der Vorbestrahlung angesehen werden. Der Transport des ausgesprochen labilen 4-Hydroxy-Cyclophosphamid auf dem Blutweg ist nur durch eine stabilisierende Bindung an SH-Gruppen von Serumproteinen möglich. Wir halten diese Hypothese jedoch nicht für wahrscheinlich. Wie erwähnt, können wir die Möglichkeit einer durch Repairenzyme gesteigerten Aktivierung von Cyclophosphamid in der bestrahlten Tumorzelle nicht ausschließen.
Weder aus den chromatographischen Analysen in den Urinsammelfraktionen, noch aus denen der Organextrakte am 5. Tag

nach Cyclophosphamid-Gabe ließen sich Einflüsse der Bestrahlung auf Intensität und Richtung der Cyclophosphamid-Metabolisierung ableiten. Um derartige Änderungen im Stoffwechsel des bestrahlten Tumors zu erfassen, wären pharmakokinetische Studien im vorbestrahlten Tumor 30 Minuten bis 4 Stunden nach Cyclophosphamid-Applikation erforderlich. Im Metabolitenspektrum der Extrakte von Tumor, Tumormuskel und Muskel ergaben sich zwischen den 4 Behandlungsgruppen keine Unterschiede. Auffällig war jedoch der Befund höchster Konzentrationsanteile der Substanzgruppe Rf 0 - 0,1 als Reaktionsprodukte mit niedrigmolekularen Peptiden (Glutathion) (41) in den Extrakten von Muskel und Tumormuskel, die in den Tumorextrakten relativ niedrig lagen. In den Extrakten der Tumoren konnte ein ausgesprochen hoher Konzentrationsanteil von mehr als 50 % an einem Metaboliten mit dem Rf 0,3 analysiert werden, der ein durch Reaktion von 4-Hydroxy-Cyclophosphamid mit vermutlich Cystein stabilisiertes Deaktivierungsprodukt mit stark polarem Charakter darstellt (12, 32, 53). Dies könnte als spezifische Schutzreaktion des Tumors und damit als Erklärung für die im Vergleich zu Muskel und Tumormuskel geringfügig niedrigeren Reaktionsabläufe gewertet werden.

Untersuchungen von Ringleb an tumortragenden Mäusen (36) ergaben einen Frühgipfel der Palliativwirkung in den ersten 6 Wochen einer kombinierten Strahlen-Cyclophosphamid-Therapie. Die Untersuchungen wurden am Crocker-Sarkom 180 der Maus sowohl mit fraktionierter Cyclophosphamid-Therapie (5 x 5 mg bis 5 x 25 mg Cyclophosphamid/kg KG), als auch bei tangentialer fraktionierter Strahlentherapie (5 x 150 rad bis 5 x 500 rad Röntgendosis) und der Kombination beider Therapieschemata (simultan im 48-Stundenrhytmus) durchgeführt. Die niedrigere bzw. stark verzögerte Absterberate in den ersten 6 Wochen führte zu einer anschließenden überschießenden Reaktion des Tumorwachstums und Absterben der Tiere in kürzestem Zeitverlauf. Ein ähnliches Bild ergab sich in unseren Überlebensversuchen bei der mit 50 rad vorbestrahlten Tiergruppe.

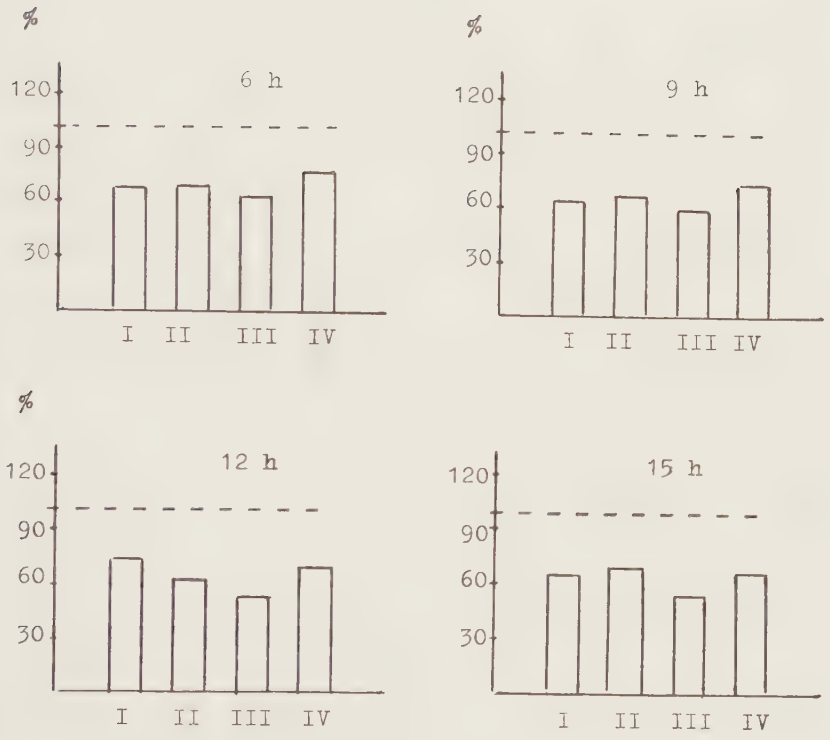
Diese Effekte können sowohl dosisabhängig, als auch in Bezug auf das Timing kritisch ausgelegt werden. Die 50 rad Dosis in unseren Überlebensversuchen könnte zu einer vermutlich kürzeren Blockade der Zellen in G_2 geführt haben, die dann aus der G_0-Phase verstärkt regeneriert wurden und in den Zyklus wieder eintreten konnten. Wir können jedoch auch nicht ausschließen, daß sich die Tumoren dieser Versuchsgruppe im Mittel in einem geringeren Wachstumsstadium befanden.

Ganzkörperbestrahlung, wie auch alkylierende Zytostatika wirken immunsuppressiv (1, 30, 33, 38, 48, 49). In früheren tierexperimentellen Untersuchungen, in denen kein additiver Effekt einer Kombinationstherapie auf experimentelle Tumoren gefunden wurde (24, 43, 44, 55), wurde postuliert, daß die Metastasierung der Impftumoren durch die zytostatische Wirkung der Alkylantien auf die humorale und zelluläre Antikörperbildung begünstigt wird. Untersuchungen von Ringleb (36) an einem nicht metastasierenden experimentellen Tumor der Maus zeigten jedoch in den Absterberaten ebenfalls keinen additiven Effekt einer Kombinationstherapie. In unseren Untersuchungen dürfte das Überleben von zwei Versuchstieren unter reiner Cyclophosphamid-Therapie bestätigen, daß vorwiegend das Tumorstadium und die Dosis die begünstigenden Faktoren für einen curativen Effekt darstellen. Bei diesen beiden Tieren konnte 64 Tage nach Therapie weder Tumormasse noch Metastasen im Organismus gefunden werden.

Bei abschließender Betrachtung der Ergebnisse unserer Untersuchungen kann der Schluß gezogen werden, daß eine Kombinationstherapie zu einem additiven zytostatischen Effekt führen kann. Wir müssen einschränkend betonen, daß unsere Ergebnisse nur für unsere Versuchsbedingung Gültigkeit besitzen können und eine Übertragung auf andere Versuchsanstellungen und Tumoren, sowie geändertes Timing nur mit Vorbehalt möglich

ist. Klinische Untersuchungen bekräftigen trotz anderer Versuchsanstellung unsere tierexperimentellen Untersuchungen. So konnten Blumenberg und Scheef (3), die 241 Patienten im finalen Stadium mit bereits bestehenden Fernmetastasen mit ultrahohen Cyclophosphamid-Stößen (60 - 80 mg/kg Körpergewicht) in Kombination mit Strahlentherapie (1000 - 2000 rad tägliche Herddosis) behandelten, über einen Beobachtungszeitraum von 2 Jahren berichten, daß bei 50 % dieses Patientengutes Remission der Tumoren und Beschwerdefreiheit erzielt werden konnten.

In unseren Überlebensversuchen waren die Auswirkungen unterschiedlicher Dosen in der Vorbestrahlung nicht eindeutig, d.h. die Vervielfachung der Strahlendosis zeigte keine linearen Effekte. Dies muß im Zusammenhang mit den gleichen Dosisleistungen bei unterschiedlichen Strahlendosen gesehen werden. Aus technischen Gründen war es nicht möglich alle Dosen in der gleichen Bestrahlungszeit zu applizieren, was sich bei den höheren Strahlendosen negativ auswirkte. Eine Absicherung bzw. möglicherweise eine Abschwächung dieser, aus unserer als nur orientierend zu bewertenden Studie erhobenen Befunde, erfordert entsprechende Tierversuche mit unterschiedlichen Tumoren in gleichen Wachstumsstadien, Variation des Timings und der Dosen, wobei vor allem die Strahlendosis gleicher Dosisleistung erhöht und gegebenenfalls fraktioniert appliziert werden sollte.



I Utilisations- Index
II Inkorporations- Index
} ^{14}C- Leucin

III Utilisations- Index
IV Inkorporations- Index
} ^{3}H- Desoxy- Thymidin

Abb. 3
Utilisations- und Inkorporations- Indices (%) von L- Leucin und Desoxy- Thymidin im Tumor der Ratte (n=4) 6, 9, 12 und 15 h nach lokaler Bestrahlung des Tumors (solides Yoshida- Sarkom) mit 150rad 85kV Rö- Strahlung

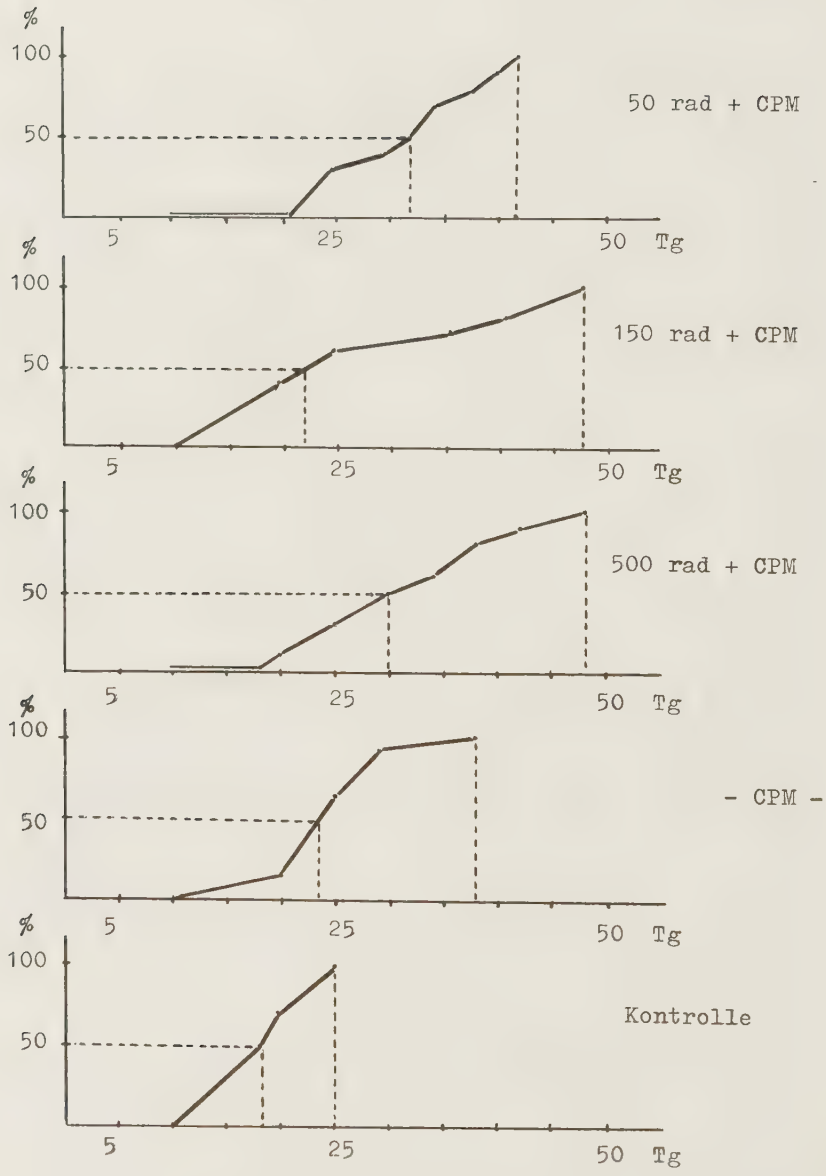


Abb. 4
Absterberaten (%) von Tumorratten nach i.v. Stoßtherapie mit 30mg Cyclophosphamid (CPM)/kg (am 5. Tag nach Tumorimplantation) ohne und mit lokaler Tumorvorbestrahlung mit Dosen von 50, 150 und 500rad 85kV Rö- Strahlung (10 Tiere je Versuchsgruppe)

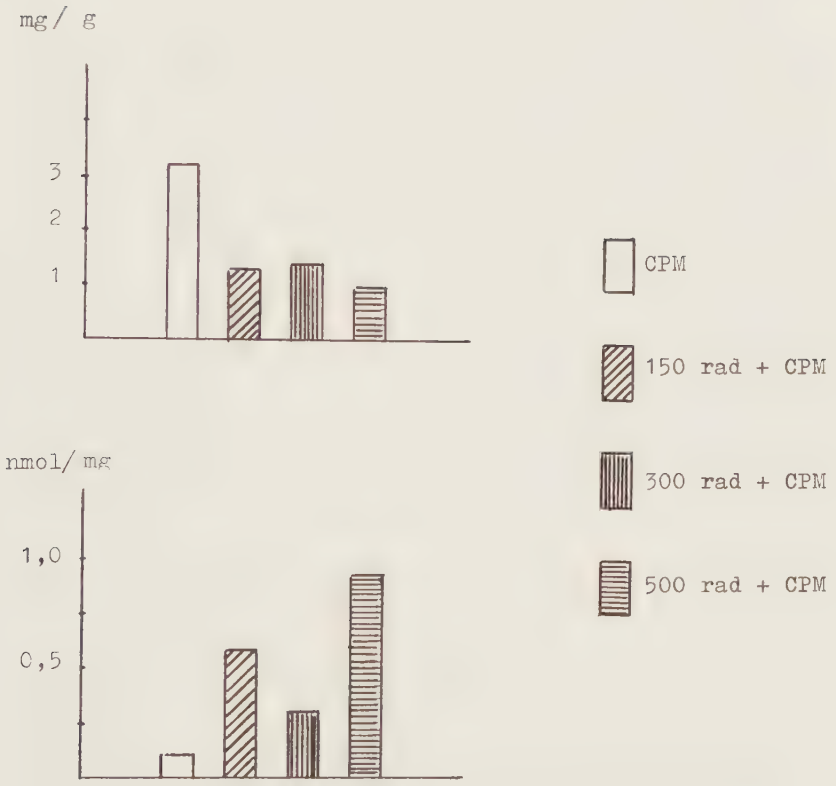


Abb. 5
Spezifischer Gehalt an DNS (mg/g) und spezifische Alkylierung der DNS (nmol/mg) im Tumor von Ratten (n=5) am 5. Tag nach i.v. Applikation von 30mg Cyclophosphamid (CPM)/kg ohne und mit lokaler Tumorvorbestrahlung mit Dosen von 150, 300 und 500rad 85kV Rö- Strahlung

V. ZUSAMMENFASSUNG

4 Gruppen von je 5 tumortragenden (solides Yoshida-Sarkom, Oberschenkel i.m.) Ratten wurden am 5. Tag nach Tumorimplantation mit einer intravenösen Dosis von 30 mg ^{3}H-Cyclophosphamid/kg Körpergewicht therapiert. 8 Stunden vor Chemotherapie wurden die Tumoren der Tiere von drei Versuchsgruppen mit Strahlendosen von jeweils 150 rad, 300 rad und 500 rad 85 kV Röntgenstrahlung lokal vorbestrahlt. Der zeitliche Abstand von 8 Stunden zwischen Vorbestrahlung und Chemotherapie wurde auf Grund der Ergebnisse eines Vorversuchs mit Ermittlung der lokalen Bestrahlungs-Effekte auf die DNS- und Proteinsynthese gewählt. Am 5. Tag p.i. wurden die Tiere 2 Stunden nach i.v. Gabe von ^{14}C-Desoxy-Thymidin getötet und in Tumor, Tumormuskel und Skelettmuskel die Restkonzentrationen, sowie der Anteil an freien Cyclophosphamid-Metaboliten ermittelt und die renalen Ausscheidungsgrößen in 24-Stunden-Sammelfraktionen analysiert und radiochromatographisch in Cyclophosphamid und stabile Metabolite differenziert. In den Tumoren wurden die Gehalte an Nukleinsäuren und ihre spezifischen Alkylierungen analysiert. Im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrollgruppe wurden die Desoxy-Thymidin-Indices in Tumor, Tumormuskel und Skelettmuskel bestimmt. In einem Überlebensversuch wurden bei Gruppen von je 10 tumortragenden Ratten, neben einer unbehandelten Kontrollgruppe, 4 Gruppen mit je 30 mg Cyclophosphamid/kg Körpergewicht therapiert und bei 3 Gruppen die Tumoren mit Dosen von 50 rad, 150 rad und 500 rad lokal vorbestrahlt.
Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen.

1. In einem Vorversuch wurden nach lokaler Tumorbestrahlung mit 150 rad Versuchstiergruppen (n = 4) 6, 9, 12 und 15 h nach Bestrahlung getötet. 2 h vor Tötung wurde den Tieren ^{14}C-L-Leucin und ^{3}H-Desoxy-Thymidin intravenös appliziert. In den Tumoren der 4 Zeitgruppen zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Permeationsgrößen für beide

Precursoren und eine signifikante Depression der Leucin-Utilisation, während die Utilisation von Desoxy-Thymidin nur in einer deutlichen Tendenz als eingeschränkt bezeichnet werden konnte. Unterschiede zwischen den Zeitgruppen waren zufällig. Unter Einbeziehung pharmakokinetischer Daten für Cyclophosphamid bei der Ratte, der Zykluszeit des eingesetzten Tumors und des nicht nachgewiesenen Synchronisationseffekts der Bestrahlung wurde ein Timing für die Kombinationstherapie von 8 Stunden gewählt.

2. Bei der nicht und den vorbestrahlten Versuchsgruppen waren Unterschiede in den renalen Ausscheidungsgrößen an Cyclophosphamid und chromatographisch charakterisierten Metaboliten bis zum 5. Tag nach ^{3}H-Cyclophosphamid-Therapie zufällig. Ein Einfluß der Bestrahlung auf Stoffwechselrichtung und -intensität konnte nicht festgestellt werden.

3. In den Tumoren der vorbestrahlten Versuchsgruppen zeigte sich eine deutliche Tendenz höherer Restkonzentrationen an Cyclophosphamid-äquimolaren Metaboliten im Vergleich zu der nicht vorbestrahlten Gruppe, was auf vermehrte Reaktionen mit Biomolekülen hinweist. In den Extraktionsgrößen der analysierten Organe zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen bei höchsten Extraktionsgrößen in den Tumoren und geringsten im Skelettmuskel. Cyclophosphamid konnte in den Extrakten nicht mehr nachgewiesen werden. Die niedrigeren Restkonzentrationen in den Tumoren im Vergleich zu den analysierten Muskelproben sind auf die deutliche Teilremission, d.h. Nekrotisierung von Tumorzellen, zurückzuführen.

4. Die spezifischen Gehalte an DNS (mg/g Tumor) lagen in den vorbestrahlten Gruppen um 50 % niedriger als in der Monotherapie-Gruppe. Die spezifischen RNS-Gehalte der Tumoren in den 4 Versuchsgruppen zeigten keine auffälligen Unter-

schiede. Die vorwiegend auf Alkylierungen zurückzuführenden Restkonzentrationen in den Tumoren zeigten höchste Anteile für die Nukleinsäuren. Die höchsten spezifischen Alkylierungen (nmol CPM/mg DNS) lagen in den vorbestrahlten Tumoren um den Faktor 4 höher als in der reinen Cyclophosphamid-Gruppe.

5. Die Desoxy-Thymidin-Indices lagen im Tumormuskel signifikant niedriger als in der unbehandelten Kontrollgruppe, höher in den Tumoren bei geringerer Signifikanz auf Grund höherer Streuungen. Unterschiede im Skelettmuskel zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen waren zufällig. Die Tumorgewichte der therapierten Gruppen lagen hoch signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe und waren in den vorbestrahlten Gruppen um etwa den Faktor 2 niedriger als in der nicht vorbestrahlten Gruppe. Die spezifischen Gehalte an DNS, die spezifischen Alkylierungen der DNS und im gewissen Sinne die Hemmung der DNS-Synthese zeigten eine auffällige Korrelation zu den Tumorgewichten, d.h. der Proliferationshemmung in den einzelnen Versuchsgruppen. Aus den Desoxy-Thymidin-Indices ließ sich für alle Versuchsgruppen ableiten, daß die Tumoren sich im Übergang in eine erneute Wachstumsphase befanden.

6. In den Überlebensversuchen ließ sich ebenfalls ein deutlicher additiver Effekt der Vorbestrahlung, wie er in den späteren Zeitpunkten der 50 %, wie auch der 100 % Absterbegrößen bei den vorbestrahlten Gruppen deutlich wurde, ableiten.

Die Ergebnisse dieser orientierenden Studie sind in ihrer Aussage begrenzt auf unsere Versuchsbedingungen, bestätigen aber einen additiven zytostatischen Effekt in der Kombinationstherapie. Dieser Effekt kann sowohl mit einer Kumulation von Zellen in der sensiblen S- G_2-Phase, einer gesteigerten Permeabilität von Cyclophosphamid in den vorbestrahlten Tumoren und einer möglicherweise gesteigerten Aktivierung von Cyclophosphamid durch enzymatische Prozesse in der Erholungsphase der Tumoren erklärt werden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

(1) Barth, G., D. Ringleb
"Radiologisch und kombiniert radiologisch - cytostatische Geschwulstbehandlung"
In: Therapie maligner Tumoren, Hrsg. Holder, E.
Bd. I, S. 824, Ferdinand-Enke-Verlag, Stuttgart 1966

(2) Bauer, K.-H.
"Das Krebsproblem"
Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg 1963

(3) Blumenberg, F.-W., W. Scheef
"Hochdosierte Cyclophosphamidbehandlung in Kombination mit Strahlentherapie bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen"
Med. Welt 37 (1969) 2024-2029

(4) Brock, N., Arbeitsgemeinschaft Cytostatika
"Forschungsbericht 1976"
BMFT - T 76 - 36 (1976)

(5) Brock, N., H.-J. Hohorst
"Über die Aktivierung von Cyclophosphamid im Warmblutorganismus"
Naturwiss. 49 (1962) 610

(6) Brock, N., H.-J. Hohorst
"Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro"
Arzneimittel-Forsch. 13 (1963) 1021

(7) Brock N., H.-J. Hohorst
"Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Endoxan"
III. Internat. Kongr. Chemother. 22. - 27.7.63,
Stuttgart, Verh. Bd. II 1089 - 1091, Thieme-Verlag Stuttgart 1964

(8) Chandra, P.
"Quantitative Bestimmung von Desoxyribonucleinsäuren"
In: Methoden der Molekularbiologie,
Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart 1973

(9) Chandra, P.
"Quantitative Bestimmung von Ribonucleinsäuren"
In: Methoden der Molekularbiologie,
Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart 1973

(10) Conners, T.A., P.J. Cox, P.B. Farmer, A.B. Forster, M. Jarman
"Some studies of the active intermediates formed in the microsomal metabolism of Cyclophosphamid and Isophosphamid"
Biochem. Pharmakol. 23 (1974) 115

(11) Cormack, D.V., G. Froese
aus: Handbuch der Medizinischen Radiologie
"A correlation between division delay and loss of colony - forming ability in cultured Chinese hamster cells"
Physical Aspects of Radiation Quality JAEA - SM - 145 / 26 S. 251 - 259 Wien 1971

(12) Draeger, U., G. Peter, H.-J. Hohorst
"Deactivation of Cyclophosphamid (NSC 26271) Metabolites by sulfhydryl compounds"
Cancer Treatm. Rep. 60 (1976) 355

(13) Draeger, U., H.-J. Hohorst
"Permeation of Cyclophosphamide (NSC 26271) metabolites into tumor cells"
Cancer Treatm. Rep. 60 (1976) 423 - 427

(14) Druckrey, H., D. Steinhoff, M. Nakayama, R. Preussmann, K. Anger
"Beiträge zum Dosierungsproblem in der Krebschemotherapie und zur Wirkungsweise des Endoxan"
III. Bielefelder Symposium 14. - 15.11.62
Hrsg. Doz. Dr. med. H. Wilmanns, F.K. Schattauer Verl. Stgt.

(15) Fritz-Niggli, H., H.U. Zollinger
In: Handbuch der allgemeinen Pathologie Bd. 10, 1. Teil: Strahlung und Wetter, Springer-Verlag (Berlin, Göttingen, Heidelberg) 1960, S.132 u. 94

(16) Hagen, U.
"Molekulare Grundlagen der Strahlensensibilisierung"
Strahlentherapie 143 3 (1972) 237 - 243

(17) Harbers, E.
Persönliche Mitteilungen

(18) Hill, D.L., W.R. Laster, R.F. Struck
"Enzymatic metabolism of Cyclophosphamide and Nicotine and production of a toxic Cyclophosphamide metabolite"
Cancer Res. 32 (1972) 658

(19) Hohorst, H.-J., U. Draeger, G. Peter, G. Voelker
"The Problem of oncostatic specificity of cyclophosphamide (NSC 26271): Studies on reactions that control the alkylating and cytotoxic activity"
Cancer Treatm. Rep. 60 (1976) 309

(20) Hohorst, H.-J., A. Ziemann, N. Brock
"4-Ketocyclophosphamide, a metabolite of cyclophosphamide. Formation, chemical and biological properties"
Arzneimittel-Forsch. 21 (1971) 1254

(21) Kayser, D.
"Einbau von Thymidin in Desoxyribonucleinsäuren - Rattenleber"
In: Methoden der Molekularbiologie, Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart 1973

(22) Klein, H.O., N. Brock, K.J. Lennartz, W.F. Feaux de Lacroix, D. Adler, R. Gross
"Weitere tierexperimentelle Untersuchungen zur pharmakologischen Induktion einer Teilsynchronisation der Tumorzellproliferation. Ihre Bedeutung für die zytostatische Behandlung."
In:"Synchronisationsbehandlung maligner Tumoren", G. Hartwich (Hrsg.) Perimed-Verlag, Dr.Dr. Straube, Erlangen 1976 (9 - 36)

(23) Klein, H.O., K.J. Lennartz
"Chemotherapy after synchronisation of tumor cells"
Sem. Haematol. 11 (1974) 203

(24) Koch, R.
"Die simultane Anwendung von Bestrahlung und Zytostatikum im Tumorexperiment"
Sdbd. zur Strahlentherapie 62 (1966) 155

(25) Linden, W.A., H. Prévôt jr., C. Schneider, H. Berg, A. Lügger
"Synchronisation des Teilungszyklus von Säugetierzellen in vitro durch fraktionierte Röntgenbestrahlung"
Strahlentherapie 140 (1970) 706

(26) Linden, W.A., F. Zywietz, H. Landen, C. Wendt
"Synchronisation des Teilungszyklus von L-Zellen in der G_2-Phase durch fraktionierte Röntgenbestrahlung und Daunomycin"
Strahlentherapie 146 2 (1973) 216 - 225

(27) Liss, E., H. Schmidt, E. Schaumlöffel, G. Palme
"Alkylierung der DNA verschiedener Tumorzellarten nach in vivo Gabe von Cyclophosphamid"
Z. Krebsforschung 80, 239 - 245 (1973)

(28) Maass, H.
"Wirkungsmechanismus alkylierender Zytostatika"
Deutsch. Med. J. 19, 1968 (137)

(29) Mittermeyer, C.H.
"Der mitolische Zyklus und seine Beeinflussung durch Zytostatika"
in Schmitt, G.G.: Fortschritte der Krebsforschung
Schattauer-Verlag, Stuttgart - New York 1969 (359)

(30) Müller, G.
"Das Tier im Strahlenversuch"
Radiobiol. Radiother. 6 (1965) 683

(31) Palme, G., E. Liss, K. Oeff
"Die Proliferationskinetik von Ehrlich-Ascites Tumorzellen unter Einwirkung alkylierender Zytostatika"
5. Intern. Kongr. Chemother., Wien 1967, Proc.-Vol. II/1 (183)

(32) Peter, G., T. Wagner, H.-J. Hohorst
"Studies on 4-Hydroperoxycyclophosphamide (NSC-181815): A simple preparation methode and its application for the synthesis of a new class of activated sulfur-containing Cyclophosphamid (NSC-26271) derivatives"
Cancer Treatm. Rep. 60 (1976) 429

(33) Potel, J.
"Einfluß von Cytostatika auf die Antikörperbildung"
III. Internat. Kongr. Chemother. 22. - 27.7.63, Stuttgart, Verh. Bd. II 1639, Thieme-Verlag, Stuttgart 1964

(34) Prévôt, H. jr., C. Schneider, W.A.Linden, H. Brunkhorst, A. Lügger
"Erhöhung der Strahlensensibilität von Säugetierzellen durch Synchronisation ihres Teilungszyklus mit fraktionierter Röntgenbestrahlung"
Strahlentherapie 141 (1971) 446

(35) Puck, T.T., P.J. Marcus
"Action of X-rays on mammalion cells"
J. exp. Med. 103 (1956) 653

(36) Ringleb, D.
"Experimente zum Verständnis der Problematik radiologisch-zytostatischer Kombinationsbehandlung"
4. Mitteilung: Synkarzinostische Untersuchungen mit Endoxan am Crocker-Sarkom 180 der Maus"
Strahlentherapie 136 3 (1968) 320 - 335

(37) Ringleb, D., H.G. Grundner, R. Krieg, R. Steckenmesser
"Untersuchungen zum Verständnis der Problematik radiologisch-zytostatischer Kombinationsbehandlung"
5. Mitteilung: Synzytostatische Untersuchungen mit 5-Fluoruracil, Natulan^{R} und Proresid^{R}.
Strahlentherapie 137 (1969) 680

(38) Robinson, R., D. Nelken
"The direct antiglobulin Consumption test after radiotherapie and chemotherapie"
Acta haemat. (Basel) 30 (1963) 138

(39) Samman, S.M.
"Kombinierte radiologisch-zytostatische Therapie in der Krebsbehandlung"
Dissertation Marburg (1974)

(40) Schaumlöffel, E.
Persönliche Mitteilungen

(41) Schaumlöffel, E., M. Clausnitzer, F. Heß, U. Röttger, R. Thome
"Vergleichende Untersuchungen zur Pharmakokinetik von ^{3}H-Cyclophosphamid und Metaboliten bei Tier und Mensch"
Therapiewoche 27, 2953 - 2987 (1977) 15

(42) Schaumlöffel, E., V. Wetzel
"Tierexperimentelle Untersuchungen über die Reaktivität stabiler Metabolite des Cyclophosphamid in vivo"
Arzneimittel-Forsch. (im Druck)

(43) Schneider, R.
"Beitrag zur Wirkungsweise einiger Zytostatika und ionisierender Strahlen"
Strahlentherapie 126 (1965) 213

(44) Schneider, R.
"Vergleichende Untersuchungen über die Wirksamkeit einiger Zytostatika und der Strahlenbehandlung bei Impftumoren im Modellversuch unter besonderer Berücksichtigung der Telegammatherapie mit Kobalt 60"
Sdbd. zur Strahlentherapie 61 (1965) 367

(45) Sinclair, W.K., R.A. Morton
"Cyctic x-ray responses in mammalion cells in vitro"
Radiat. Res. 33 1968, (620 - 643)

(46) Sladek, N.E.
"Evidence for an aldehyde possessing alkylating activity as the primary metabolite of Cyclophosphamide"
Cancer Res. 33 (1973) 651

(47) Steiner, B., H. Arnold, E.H. Graul, H. Beckel, H. Wilmanns
"Zur Synthese von Tritium-markiertem Cyclophosphamid (einem Krebschemotherapeutikum) hoher spezifischer Aktivität"
Atompraxis 10 (1964) 358

(48) Stender, H.S., D. Ringleb, D. Strauch, H. Winter
"Die Beeinflussung der Antikörperbildung durch Zytostatika und Röntgenbestrahlung"
Sdbd. zur Strahlentherapie 43 (1959) 392

(49) Stender, H.S., D. Strauch, H. Winter
"Vergleichende Untersuchungen über die Behinderung der Antikörperbildung durch Röntgenstrahlen und einem N-Lost-Phosphamidester"
Strahlentherapie 115 (1961) 175)

(50) Takamizawa, A., Y. Tochino, Y. Hamashima, T. Iwata
"Studies on Cyclophosphamide metabolites and their related compounds. II Preparation of an active species of cyclophosphamide and related compounds."
J. Med. Chem. 18 / 4 (1975) 376 - 383

(51) Takamizawa, A., Y. Tochino, Y. Hamashima, T. Iwata
"Studies on cyclophosphamide metabolites and their related compounds. I."
Chem. Pharm. Bull. 20 (1972) 1612 - 1616

(52) Trott, K.-R.
"Handbuch der medizinischen Radiologie"
Vol. II Part. 3 S. 68, Springer-Verlag, Berlin 1972

(53) Voelker, G., T. Wagner, H.-J. Hohorst
"Identification and pharmacokinetics of Cyclophosphamide (NSC - 26271) metabolites in vivo"
Cancer Treatm. Rep. 60 (1976) 415

(54) Voelker, G., U. Draeger, G. Peter, H.-J. Hohorst
"Studien zum Spontanzerfall von 4-Hydroxy-Cyclophosphamid und 4-Hydroperoxy-Cyclophosphamid mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie"
Arzneimittel-Forsch. (Drug. Res.) 24 / 8 (1974) 1172

(55) Woenckhaus, H.J., D. Klemm, B. Obrecht
"Untersuchungen über die Verlängerung der Überlebenszeit von RF-Mäusen mit Retothelsarkom durch die Kombination von Strahlen und Chemotherapie"
Klin. Wschr. 43 (1965) 793

Herrn Prof. Dr. E. Schaumlöffel bin ich zu großem Dank für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Hinweise und Anregungen verpflichtet. Ihm gilt auch mein Dank für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit an dem medizinischen Zentrum für Radiologie der Philipps - Universität Marburg.

Ebenso möchte ich an dieser Stelle den Angehörigen der Abteilung für experimentelle Nuklearmedizin im medizinischen Zentrum für Radiologie, besonders Fräulein Clausnitzer, Frau Thome und Herrn Kreyling, für die bereitwillige Unterstützung bei den Laboruntersuchungen und der statistischen Auswertung meinen Dank aussprechen.

Die Untersuchungen wurden teilweise durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie unterstützt.

Lebenslauf

Am 22. März 1951 wurde ich in München geboren. Von 1957 - 1962 besuchte ich die Grundschule in München - Obermenzing. Nach dem 5. Grundschuljahr erfolgte der Übertritt in das Neusprachliche Gymnasium der Englischen Fräulein in München-Nymphenburg, wo ich am 19. Juni 1971 das Abitur ablegte. Zum Wintersemester 1971 konnte ich glücklicherweise mein Studium der Zahnheilkunde an der Philipps - Universität Marburg beginnen. Am 13. September 1972 bestand ich hier die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 15. März 1974 die zahnärztliche Vorprüfung. Nach 10 Semestern Studium legte ich die zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen) am 20. Dezember 1976 ab. Seit 1. Februar 1977 befinde ich mich in kieferorthopädischer Fachzahnarztausbildung, wobei mir die Gelegenheit gegeben wurde, ein Jahr in der Zahn-, Mund- und Kieferklinik der Philipps-Universität Marburg, Kieferorthopädische Abteilung zu arbeiten. Seit 1. März 1978 setze ich diese Ausbildung in einer kieferorthopädischen Praxis in Landshut fort.
Am 20. Mai 1977 heiratete ich Herrn Dr. Meereis.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten

Ahrens, Amon, Baltzer, Bernhardt, Bode, Braasch, Castenholz, Dimroth, Floréz-Cossio, Geißler, Haberich, Hennis, Hensel, Hering, Heubl, Heuser, Hilgermann, Jahnke, Karlson, Kleinsasser, Koecke, Koransky, Lauer, Lehmann, Maroske, Niemeyer, Petry, Pfütz, Richter, Rohen, Rupec, Schachtschabel, Schaumlöffel, Schiff, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schneider, Schnell, Schulte-Herrmann, Spröggel, Thoenes, Wesemann, Wetzel, Wiegand.